

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
KEEMIA INSTITUUT  
MOLEKULAARTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Laura Puusepp

**ESIMESTE CHIKUNGUNYA VIIRUSE  
PROTEAASI INHIBIITORITE DISAIN JA  
TESTIMINE**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: prof. Mati Karelson

Tartu 2015

# SISUKORD

1. SISSEJUHATUS.....	2
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	4
2.1. Viiruse iseloomustus.....	4
2.2. CHIKV viroloogia.....	5
2.2.1. Mittestruktuursed valgud.....	6
2.2.2. Struktuursed valgud.....	8
2.3. Chikungunya viiruse (CHIKV) sihtimine (targeting).....	8
3. METOODIKA.....	12
3.1. Modelleerimine.....	12
3.2. Eksperimentaalne osa.....	15
4. TULEMUSED JA ARUTELU.....	17
4.1. Ülesande püstitus ja hüpotees.....	17
4.2. Eksperimentaalsete katsete tulemused.....	24
4.3. Tuntud aktiivsete ühendite täielik molekulaarsildamise analüüs.....	28
5. KOKKUVÕTE.....	32
6. SUMMARY.....	33
7. KASUTATUD KIRJANDUS.....	34
8. LISAD.....	38
9. LITSENTS.....	57

# 1. SISSEJUHATUS

Chikungunya (CHIKV) on troopiline viirus, mis põhjustab Chikungunya infektsiooni, mille peamiseks sümptomiteks on kõrge palavik ning liigeste paistetus. Sümptomid avalduvad 2.-12. päeval pärast nakatumist. Ühel juhtumil tuhandest lõpeb haigusjuhtum surmaga ning enamasti surevad vanemad inimesed. Viirust kannavad edasi põhiliselt *Aedes albopictus* ja *Aedes aegypti* liiki sääsed. Lisaks inimestele kannavad sääsed viirust edasi ka teistele imetajatele ja lindudele.

Chikungunya esineb peamiselt arengumaades ning selle levimine on seotud sääskede levikuga ning inimeste eluviisiga. Viimasel ajal on viiruse leviala hakanud laienema, ulatudes Põhja-Ameerikasse, esimesed juhud on täheldatud ka Euroopas. Parim teadaolev moodus viiruse ennetamiseks on vältida kokkupuudet sääskedega. Selleks kasutatakse erinevaid putukatõrje vahendeid. Mõjusat viirusevastast ravi seni ei tunta, aga erinevate ravimitega on võimalik sümptomeid leevendada. Hetkel ei ole heaks kiidetud ka ühtegi vaktsiini, mis oleks läbinud inimkatsed. Isegi kui leitakse vaktsiin Chikungunya viirusele, siis sellest üksi ei piisa haigusega võitlemiseks.

Käesoleva lõputöö peamiseks eesmärgiks oli uute võimalike toimeainete leidmine CHIKV vastu, kasutades ravimidisaini. Ravimidisain on protsess leidmaks uusi toimeaineid teadaolevatele haigusega seotud bioloogilistele märklaudadele. Enamasti on ravim madalmolekulaarne orgaaniline ühend, mis aktiveerib või inhibeerib biomolekuli funktsiooni. Ravimidisain põhineb sageli arvutiga modelleerimise tehnikatel, sel juhul saab seda nimetada arvutipõhiseks ravimidisainiks.

Bioloogilisteks märklaudadeks on peamiselt suured orgaanilised molekulid, eelkõige valgud või nukleiinhapped. Üldjuhul on nad olulised mingis kindlas metabolismi või signaalülekande etapis ning seotud teatud haiguse ilmnemisega. Ravimaineteks on enamasti väiksemad orgaanilised ühendid – ligandid, mis inhibeerivad haigusega seotud või haigust põhjustavaid protsesse.

Ravimidisain võib olla kas ligandi- või struktuuripõhine. Ligandipõhine ravimidisain toetub olemasolevatele uuritavale bioloogilisele sihtmärgile seonduvate ühendite aktiivsustele. Teadaolevate eksperimentaalsete andmete alusel saab moodustada struktuur-omaduste sõltuvusi ennustamiseks uusi sobivaid ravimikandidaate.

Struktuuripõhine ravimidisain põhineb bioloogilise sihtmärgi 3D struktuuril. Üheks võimaluseks on virtuaalselt sõeluda andmebaasides olemasolevaid molekule vastavalt etteantud tingimustele ning seejärel sobitada neid biomolekuli aktiivsesse saiti. Sellise lähenemise korral saab oluliselt kokku hoida ravimi arendamiseks kuluvat aega. Alternatiivne võimalus on fragmendipõhine disain, mille puhul muudetakse ligandi molekuli fragmente ning leitakse täiesti uus aktiivne ühend.

Käesolevas töös otsiti uusi CHIKV inhibiitoreid, võttes bioloogiliseks märklauaks viiruse proteaasi. Selleks kasutati Protein Data Bank andmebaasis olevat vastavat CHIKV nsP2 valgu 3D kristallstruktuuri. Sobiva ligandi leidmiseks rakendati arvutiprogrammi Autodock 4.2. Sobitades erinevaid ligande viiruse proteaasi aktiivsesse saiti, seati eesmärgiks leida andmebaasides saadaval olevate ainete hulgast parima sidumisen energiaga ühendid ning teha neile bioloogilised intaktse viiruse ning viiruse proteaasi inhibeerimise katsed.

## 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 2.1. Viiruse iseloomustus

Chikungunya viirus (CHIKV) on sääsehammustuste teel leviv alfaviirus, mis kuulub *Togaviridae* sugukonda. See põhjustab chikungunya palavikku, mis on seotud tõsise liigesepõletiku ja lööbega. Nimetus Chikungunya tuleneb Makonde (Bantu keele) sõnast ning tähendab “See, mis paistetak üles”, viidates nakatunud patsiendi tugevale valule liigestes.<sup>[1]</sup>

Chikungunya viirust kannavad edasi *culicine* sääsed ja see mõjutab nii selgroogseid kui lüljalgseid, kusjuures lüljalgsed jäävad nakatunuks terve oma elu vältel. Viiruse kandumine inimesele toimub üldiselt läbi *Aedes* liiki sääskede. Enamasti on haiguse ülekandega seotud *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* ja *Aedes polynesiensis* liigid, aga mõnel juhul on haigus edasi kandunud ka läbi *Culex* liiki sääskede.<sup>[1]</sup>

CHIKV haigestumise puhangud on perioodilised, peiteajaga 3-4 aastat, lähtudes selle tsüklilisest ahvites. Nakatumisel kopeeritakse CHIKV nahas ja levib maksa, lihastesse, liigestesse, lümfi kudedesse (lümfi sõlmedesse ja põrna) ning ajju, arvatavasti vere kaudu.<sup>[1]</sup>

Patoloogilised nähud on seotud koe nakatumisega, enamasti maksas ja lümfiorganites, mis tekitab tugevat valu lihastes ja liigestes, kutsudes mõnel juhul esile liigesepõletiku.<sup>[1]</sup> CHIKV infektsiooni sümptomid on kõrge palavik, jäikus, peavalu ning valgusekartsus. Enamus nakatunutest kaebavad liigesevalu üle ja on esinenud ka kubeme lümfadenopaatiat. Haiguse akuutne faas kestab mõnest päevast mõne nädalani. Lihase ja luude valud võivad aga kesta aastaid peale akuutse faasi põdemist.

Viirus sai arvatavasti alguse Aafrikast, kus see töötas välja oma elutsükli, kaasates metsikuid primaate ja metsas elutsevaid sääski.<sup>[1]</sup> Chikungunya palavikku on esmakordselt registreeritud 1952. aastal Tansaania ja Mosambiigi piiril asuval Makonde tasandikul. Chikungunya viirus eraldati 1953. aastal.<sup>[1]</sup> Esimene dokumenteeritud puhang Aasias oli 1958. aastal. Aafrika ja Aasia puhanguid oli raske ette ennustada, kuna kahe järjestikuse epideemia vahele jäi 7 kuni 20 aastase intervalliga peiteaeg.<sup>[1]</sup>

Fülogeneetiline analüüs jagab CHIKV kolme põhilisse genotüüpi vastavalt

geograafilisele päritolule. Esimene klaad hõlmab viiruseid Senegalist Nigeeriani, moodustades Lääne-Aafrika genotüübi. Ülejäänud klaadid levivad kahes piirkonnas: üks asetseb Kesk- ja Ida-Aafrikas (kesk/ida aafrika genotüüp) ning teine Aasia piirkonnas.<sup>[1]</sup>

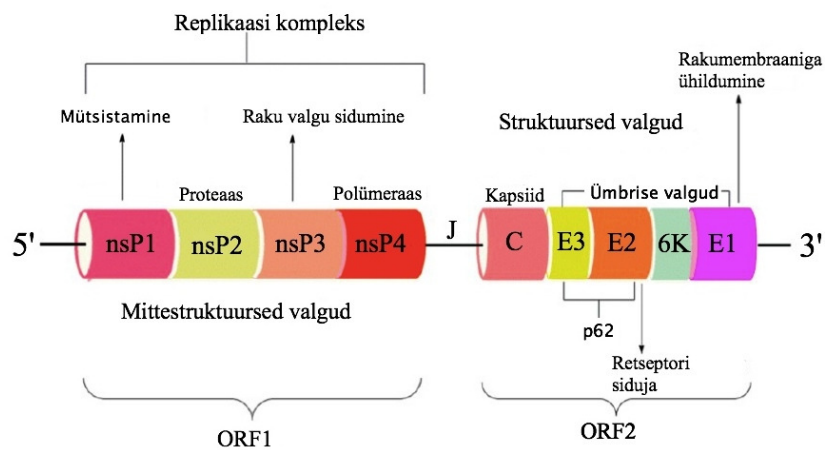
Chikungunya viirusele ei ole senini leitud ravimit ega ka toimivat vaktsiini. Nakatunud inimesed peavad olema kaitstud edasiste sääsehammustuste eest, jäädes siseruumidesse ja kaitstes end sääsevõrguga haiguse esimestel päevadel, et nad ei saaks osaleda viiruse edasises tsüklis.<sup>[1]</sup> Laboratoorne diagnostika põhineb viiruse detekteerimisel varajases staadiumis ja/või spetsiifilise CHIKV vastase IgM ja IgG vereproovi analüüsiga.<sup>[1]</sup>

Vaktsiinide või efektiivsete CHIKV vastaste ravimite puudumisel kasutatakse tänaseni kliiniliste ilmingute vastaseid sümptomaatilisi toimeaineid. Enamjaolt on selleks kasutusel mitte-salitsüütsed valuvaigistid ja mittesteroidsed põletikuvastased ravimid (NSAID).<sup>[2]</sup> Viiruse näidustuste ravi keskendub enamasti mittesteroidsetele põletikuvastastele ravimitele, mis võimaldab patsientidele tihti vaid osalist kergendust. Mittesalitsülaatsete valuvaigistitena kasutatakse paratsetamooli, atsetaminofeeni, morfiini ja traditsioonilist taimset meditsiini. Liigesepõletiku ravimis kasutatakse kortisoidseid steroide.<sup>[2]</sup> Klorokiin, mis on kasutusel mõnede autoimmuunsete haiguste ravis, leiti efektiivselt toimivat ka kroonilisele CHIKV põhjustatud liigesepõletikule.<sup>[3]</sup> Tuntud viirusevastane ravim ribaviriin on *in vitro* katsetes näidanud mõju RNA viiruste inhibeerimisel.<sup>[3]</sup> Seejuures interferoon-alfa ja ribaviriini kombinatsioon on näidanud ka CHIKV *in vitro* inhibeerimisel efekti võimendumist. Isegi kui interferoon tavaliselt tõstab immuunset vastupanu, soovatakse selle võtmisel olla ettevaatlik, kuniks uuritakse ulatuslikumalt primaatmudeleid.

## 2.2. CHIKV viroloogia

CHIKV on alfaviirus, mille genoom sisaldab 11,8 tuhat aluspaari positiivse ahelaga üksikut niitjat RNA-d. Sarnaselt *Flavivirus* genoomile moodustatakse selle alusel samuti mittestruktuurseid ja struktuurseid valke. Mittestruktuursed valgud, nsP1-4, kodeeritakse CHIKV RNA 5'-terminaalses otsas.<sup>[4]</sup> Neist nsP1 on kaasatud viirusliku

mRNA pakkimisse guaniin-7-metüültransferaasi ja guanüülültransferaasi ensümaatiliste aktiivsuse kaudu. Mittestruktuurne valk nsP2 käitub kui proteaas ja helikaas, nsP3 katab osa replikaasi struktuurist ning on kaasatud ka RNA sünteesi. Valk nsP4 käitub RNAs sõltuva RNA polümeraasina. Mittestruktuursete valkude prekursor nsP123 ja nsP4 osalevad viiruse negatiivse ahelaga RNA sünteesi kompleksis. CHIKV genoomi 3'-terminaalses otsas on kodeeritud struktuursed valgud, s.o. kapsiid C, glükoproteiinid E1 ja E2 ning kaks väiksemat valku (E3 ja 6K) (vt. joonis 1)<sup>[5]</sup>



Joonis 1.

CHIKV genoomi skemaatiline esitus.

### 2.2.1. Mittestruktuursed valgud

Viiruse mRNAs kodeeritud kaks valkude prekursorit moodustavad lagunemisel mittestruktuursed valgud nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4. Translatsiooni ajal seostub prekursor nsP123 vaba nsP4 ja mõnede rakus olevate valkudega, moodustades replikatsioonikompleksi, mis sünteesib vajaliku täispikkuses negatiivse ahelaga RNA.

Chikungunya viiruse mittestruktuurne valk nsP1 sisaldab 535 aminohappe jääki. Selle N-terminaalne regioon vastutab metüültransferaasi ja guanüülültransferaasi aktiivsuste eest. On täheldatud, et see valk mängib olulist rolli luuüdi antigeen-2 (BST-2) alaregulatsioonil. Viimane on seotud viiruse infektsiooniga rakus ning seega võiks nsP1 olla potentsiaalseks märklauaks CHIKV ravi arendamisel.<sup>[4][5]</sup>

CHIKV nsP2 lõhustab viiruse valgukompleksi neljaks mittestruktuurseks valguks,

kasutades selleks C-terminali piirkonnas lokaliseeritud tiooli proteaasi aktiivsusega kompleksi. CHIKV nsP2 omab ka RNA trifosfataasi aktiivsust, mis on vajalik RNA mütsistamiseks ning mis toimub nsP2 N-terminali piirkonnas. NsP2 proteolüütiline aktiivsus on kriitilise tähtsusega viiruse replikatsioonil, kuna see tagab mittestruktuurse polüproteiini kompleksi lõhustamise. Hiljuti on kindlaks tehtud CHIKV nsP2 kristallstruktuur, mis kajastab nii C-terminali kui ka N-terminali ning võib olla oluline lähtepunkt uute CHIKV vastaste ravimite arendamisel.<sup>[4][5]</sup> Mittestruktuurse valgu nsP2 proteaasi aktiivsait asub C-terminali domeenis Gln1039, Lys1045, Glu1157, Gly1176, His1222, Lys1239, Ser1293, Glu1296 ja Met1297 aminohappe jääkide piirkonnas, moodustades individuaalse funktsionaalse piirkonna koos lõhustatavate mittestruktuursete valkude kompleksidega.<sup>[5]</sup>

CHIKV mittestruktuurne valk nsP3 sisaldab kahte põhilist domeeni. Selle, nagu ka teiste alfaviiruste nsP3 funktsioon ei ole veel täpselt välja selgitatud, aga teadaolevalt mõjutab selle mutatsioon viiruse replikatsiooni erinevaid etappe<sup>[5]</sup>. On alust arvata, et nsP3 N-terminali makrodomeen seob ADP-riboosi derivaadid ja võib mängida olulist rolli rakusisestel regulatsioonidel. CHIKV nsP3 makrodomeeni kristallstruktuur (PDB: 3GPO) on kindlaks tehtud. ADP-riboosi sidumiskoht on oluline aktiivne sait selles ning potentsiaalne märklaua uute viiruse vastaste ravimite arendamisel. C-terminali domeen on vähem konserveerunud kui N-terminali domeen ja sisaldab olulisi fosforüleeritud jääke, mis on vajalikud RNA sünteesiks. Hiljutistes töödes on näidatud, et nsP3 domeen on vastasmõjus raku valkude SH3 domeeniga ning mõjutab seeläbi mitmeid raku funktsioone. Vastastikune toime konserveerunud SH3 domeeni ja raku olevate valkude vahel viitab selle domeeni osalemisele viiruse replikatsioonil ning seega võib nsP3 olla oluliseks sihtmärgiks viirusevastase ravimi arendamisel.<sup>[4][5]</sup>

CHIKV nsP4 on RNA-st sõltuv RNA-polümeraas, mis eeldatavasti osaleb valgu lahti pakkimisel raku. CHIKV nsP4 kristallstruktuur ei ole veel kindlaks tehtud, seega ei ole teada ka selle konformatsioon ja siduv pinnastruktuur. Edasised nsP4 uuringud võivad kindlaks teha selle valgu täpsema rolli viiruse replikatsioonis ning ka sellest võib saada tulevikus potentsiaalne ravimiarenduse sihtmärk.<sup>[4]</sup> Ka on leitud, et CHIKV nsP4 vähendab märgatavalt I tüüpi interferoonide (eIF2 $\alpha$ ) fosforülatiooni, osaledes seega viiruse valgu translatsioonis. Seda teadmist võib samuti rakendada CHIKV vastase märklaua otsimisel.<sup>[5]</sup>



### 2.2.2. Struktuursed valgud

CHIKV sisenemine nakatuvasse rakku teostub viiruse kahe glükoproteiini, E1 ja E2 abil. Mõlemad kannavad endas põhilisi antigeenseid determinante ning moodustavad viriooni ikosaeedrilise kesta. Glükoproteiinid E1 ja E2 tekivad prekursori p62 furiinsel lagunemisel, E2 vastutab retseptorite sidumise eest, E1 aga vahendab membraaniga ühildumist.

Glükoproteiin E3, mis koosneb p62 64-st aminoterminaalsest aminohappe jäägist, kaitseb E2-E1 heterodimeeri enneaegset ühildumist raku membraaniga. CHIKV p6-E1 (varajase) ning E3-E2-E1 (küps) glükoproteiinkompleksi kristallstruktuur on kindlaks tehtud (pdb:3N40 ja 3N42). On välja pakutud ka ravimiarenduseks võimalikud piirkonnad nendes struktuurides <sup>[5]</sup>.

### 2.3. Chikungunya viiruse (CHIKV) sihtimine (targeting)

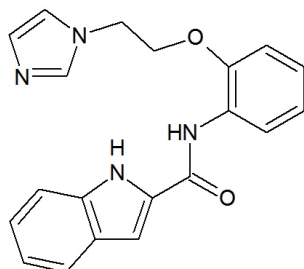
Viiruse elutsükli olulistes etappides osalevad valgud on võimalikud sihtmärgid ravimidisainis CHIKV vastu (vt. joonis2).<sup>[5]</sup> Suuremat tähelepanu äratavad siinjuures viiruse RNA genoomi translatsiooni ja replikatsiooniga seotud mittestruktuursed valgud nsP2 ja nsP3, aga ka viiruse kokkupakkimisel osalevad struktuursed valgud.

CHIKV mittestruktuursete valkude uute inhibiitorite uurimine saab aina enam tähelepanu kristallograafilise materjali olemasolu ja ensüümipõhiste analüüsitehnikate arenduste tõttu. Hiljuti leiti rida uusi CHIKV nsP2 inhibiitoreid, kasutades arvutuslikku modelleerimist ja keemilist sünteesi. Nii näiteks pidurdas üks võimalikest inhibiitoritest CHIKV viiruse replikatsiooni 50% efektiivsusega kontsentratsioonil 3,2 µM, olles seega võimalikuks lähtestruktuuriks edasistel ravimikandidaatide otsingutel.<sup>[6]</sup>

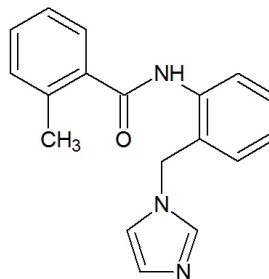
Arvutikeemilised lähenemised nagu molekulaardünaamika ja farmakofoorne kaardistamine võimaldavad identifitseerida potentsiaalseid *in silico* tabamusi kui CHIKV erinevate struktuursete ja mittestruktuursete valkude funktsionaalse aktiivsuse inhibiitoreid.



N-[2-(imidasool-1-üülmetüül)fenüül]-2-metüülbensamiid (II) on küllaltki erinevad, kuigi ühendavaks lüliks mõlemal juhul on bensamiidi struktuur.



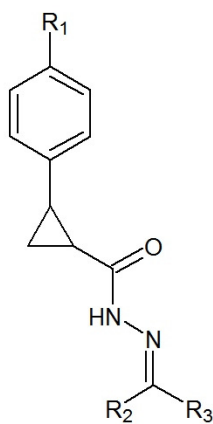
(I)



(II)

Kahjuks puudub aga sellest töös ennustatud ühendite CHIKV inhibeeriva aktiivsuse eksperimentaalne kontroll.

Bassetto, jt.<sup>[10]</sup> on kasutanud CHIKV proteaasi aktiivsuse modelleerimiseks Venetsueela entsefaliidi viiruse (VEEV) nsP2 proteaasi (PDB ID: 2HWK) homoloogilist mudelit, leidmaks molekulaarsildamise teel uusi potentsiaalseid viiruse inhibiitoreid. Kuigi töös puudub korrelatsioon molekulaarsildamise efektiivsuste ja eksperimentaalselt mõõdetud viiruse inhibeerimise aktiivsuste IC50 vahel, leiti siiski mitmed madalas mikromolaarses kontsentratsioonis toimivad viiruse inhibiitorid. Aktiivsed ühendid vastasid üldvalemile (III).



(III)

CHIKV viiruse inhibeerimise efektiivsus oli parimatel ühenditel vahemikus  $EC_{50} = 3.2 \dots 6.4 \mu M$ . Märkimist väärib aga, et tegemist oli elusa viiruse inhibeerimisega ning puudus kontroll nsP2 proteaasi inhibeerimise näol.

Kombinatsioon virtuaalsest sõelumisest ja molekulaardünaamika simulatsioonidest võimaldas leida CHIKV nsP3 makrodomeeni erinevaid märklaudu<sup>[11]</sup>. Modelleerimise tulemused viitavad kolme võimaliku sidumise saidi olemasolule nsP3 valgus. USA Rahvusliku Vähiinstituudi andmebaasis *NCI Diversity Set II* oleva 1541 ühendi virtuaalse sõelumise käigus leiti parimad molekulaarsildamisel seonduvad ühendid, sidumise vaba energiaga vahemikus  $\Delta G = -8.3 \dots -11.1 \text{ kcal/mol}$ . Ühendite molekulaarne struktuur oli seejuures väga erinev. Vaatamata sellele, et need tabamused on põnevad teerajad edasistel uute Chikungunya vastaste proteaasi inhibiitorite disainimisel, puudub senini nende inhibeeriva toime eksperimentaalne kontroll nii nsP3 valgule kui ka elavale viirusele.

CHIKV infektsiooni saab blokeerida, valides märklauaks struktuursed glükoproteiinid E2 ja E3. Sellist blokeerimist on näidatud in vitro katsetes, kus blokeeriti rakusisene furiini poolt toetatud viiruse kesta glükoproteiinide E2E3 või prekursori p62 lahutamine aktiivseteks valkudeks. A.A. Rashad jt.<sup>[12]</sup> on kindlaks teinud võimalikud blokeerimist toetavad sidumiskohad glükoproteiini kompleksi kahele vormile (PDB : 3N40 ja PDB:3N42) ning ennustanud molekulaarsildamise abil potentsiaalselt aktiivseid ühendeid. Kahjuks puudub ka sel juhul ennustatud ühendite aktiivsust tõestav eksperimentaalne kontroll.

### 3. METOODIKA

#### 3.1. Modelleerimine

##### **Modelleerimise meetodid: molekulaarsildamine ja farmakofooride meetod**

Kõigis seni teadaolevates Chikungunya viiruse inhibeerimist puudutavates töodes on erinevate meetoditega mõõdetud madalmolekulaarsete keemiliste ühendite inhibeerivat toimet viirusele kui tervikule (vt. Tabel I lisas). Seega puuduvad andmed mingi konkreetse CHIKV elutsükliga seotud valgu inhibeerimise kohta. Samuti on ühe meetodikaga mõõdetud inhibiitorite arv väike (kuni 20), mis ei võimalda ligandipõhise molekulaardisaini kasutamist uute aktiivsete ühendite leidmiseks. Käesolevas töös lähtusime seetõttu Bassetto jt.<sup>[10]</sup> molekulaarsildamise tulemuste alusel püstitatud hüpoteesist, et seeria uuritud ühendite jaoks (BAS seeria Tabelis I lisas) on inhibeerimise märklauaks CHIKV nsP2 proteaas. Uute aktiivsemate ühendite leidmisel võtsime aluseks nende poolt leitud CHIKV inhibiitori BAS1 struktuuri. Ühendite genereerimiseks jagasime molekuli fragmentideks ning muutsime selle struktuuri, kasutades farmakofoorseid asendusi.

Rühmade asendamisel erinevate struktuursete analoogidega genereeriti 60 uut ühendit, mille molekulaarsildamine CHIKV nsP2 proteaasiga viidi seejärel läbi programmi AutoDock 4.2 abil<sup>[13]</sup>. Tehti kindlaks, millised struktuursed fragmendid avaldavad sidumisenergiale enim mõju ning viidi läbi vastav virtuaalne sõelumine MolPort<sup>[14]</sup> ja ZINC<sup>[15]</sup> andmebaasides. Andmebaasidest valiti välja 70 uut ühendit vastavalt alamstruktuuri otsingutele ning sooritati taas nende molekulaarsildamine CHIKV nsP2 valgu aktiivsesse saiti.

Molekulaarsildamisel kasutatud CHIKV nsP2 valgu 3D kristallstruktuur saadi Protein Data Bank<sup>[16]</sup> andmebaasist (PDB:3RTK) ning sellele lisati hüdrofoobsed vesiniku aatomid. Käesolevas töös vaadeldi valku jäiga molekulina ega võetud arvesse selle liikuvust. Enne molekulaarsildamist optimeeriti ligandide geomeetriline struktuur programmi Maestro 9.5 abil, kasutades poolempiirilist RM1 meetodit<sup>[17]</sup>. Molekulaarsildamiseks piirati aktiivne sait griidikastiga, mille suuruseks määrati 70 x 70 x 70 Å. Molekulide vaheliste vastasmõjude arvutamiseks kasutati Autodock 4.2 spetsiifilist jõuvälja, mis on parametrizeeritud, kasutades eksperimentaalseid teadaolevate valk-inhibiitor komplekside inhibeerimiskonstante  $K_i$  ja molekulaarseid

struktuure. Jõuvälja toimet sidumist arvutatakse kahes etapis<sup>[18]</sup>. Esmalt lähtutakse eraldiseisvatest ligandi ja valgu molekulidest ning leitakse energia muutus nende üleminekul seotud olekusse. Teises etapis arvutatakse energia muutus ligandi ja valgu kombineerimisel seotud olekus. Jõuväli koosneb kuuest paarikaupa energeetilisest panusest ning konformatsioonilise entroopia muutusest seondumise käigus ( $\Delta S_{conf}$ ):

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf}) \quad (1)$$

kus  $L$  tähistab ligandi ning  $P$  – valku.

Iga paarikaupa energeetiline panus koosneb dispersioon-tõukumise energiast ( $V_{vdW}$ ), vesiniksideme(te) energiast ( $V_{HB}$ ), elektrostaatilisest energiast ( $V_{elec}$ ) ning desolvatatsiooni energiast ( $V_{sol}$ ):

$$V = V_{vdW} + V_{HB} + V_{elec} + V_{sol} \quad , \quad (2)$$

kus

$$V_{vdW} = W_{vdW} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (3)$$

$$V_{HB} = W_{HB} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \quad (4)$$

$$V_{elec} = W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} \quad (5)$$

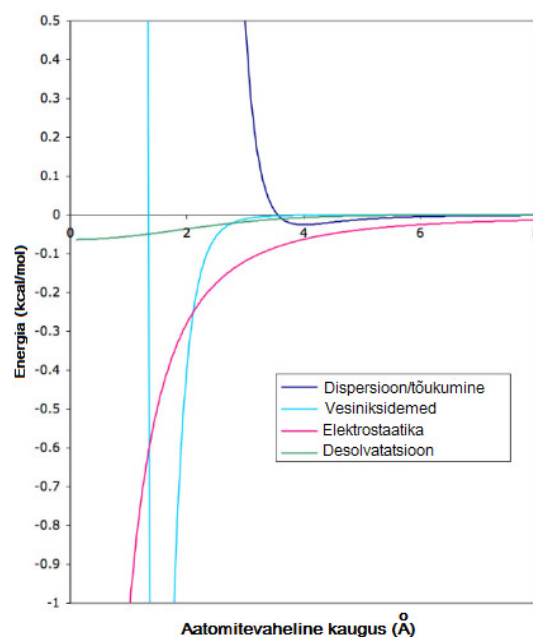
$$V_{sol} = W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (6)$$

Viimastes võrrandites (1-6) on kordajad  $W$  optimeeritud kalibreerimaks vaba energiat eksperimentaalselt teadaolevate sidumiskonstantide alusel. Esimene võrrand ( $V_{vdW}$ ) esitab tüüpilist Lennard-Jonesi 6-12 potentsiaali, mille parameetrid on võetud AMBERi<sup>[19]</sup> jõuväljast. Teine võrrand ( $V_{HB}$ ) esitab suunatud vesiniksideme 10-12 potentsiaali, mille parameetrid  $C$  ja  $D$  on kohandatud nii, et annaksid maksimaalseks potentsiaali sügavuseks 5 kcal/mol 1.9 Å kaugusel O ja N aatomite vesiniksideme korral ning 1 kcal/mol 2.5 Å kaugusel S aatomit hõlmava vesiniksideme korral. Funktsioon  $E(t)$  arvestab vesiniksideme energia muutust kõrvalekaldumisel ideaalsest sideme lineaarsest geometriast nurga  $t$  võrra. Kolmas võrrand kajastab varjestatud Coulomb'i elektrostaatilist potentsiaali, kus  $q_i$  ja  $q_j$  tähistavad osalaenguid

interakteeruvatel aatomitel ning  $e(r_{ij})$  on varjestustegur. Viimane võrrand kirjeldab desolvatatsiooniga seotud potentsiaali, mis põhineb aatomite ruumalal ( $V$ ) ja solvatatsiooni parameetril ( $S$ ).

AutoDock 4.2 programmis kasutatud AMBERi aatomitevaheliste vastasmõju potentsiaalide üldine kuju on toodud joonisel 3.

Joonis 3. AMBERi aatomitevaheliste vastasmõjude potentsiaalide sõltuvus aatomite vahelisest kaugusest.



Molekulaarsildamine viidi läbi kasutades Lamarcki geneetilist algoritmi (LGA). See algoritm põhineb Lamarcki geneetikal, kus subjekti fenotüübi kohanemine keskkonnale kajastatakse tema genotüübis ning see muutub pärilikuks. Antud geneetilise algoritmi rakendusel koosneb iga kromosoom seitsmest reaalarvulise väärtusega geenist, mis vastavad kolmele ligandi ruumilist asendit kirjeldavast Cartesiuse koordinaadist, neljast muutujast, mis defineerivad spetsiifiliselt ligandi orientatsiooni ning ühest reaalarvulisest muutujast iga ligandi torsiooni jaoks, selles järjestuses <sup>[20]</sup>. LGA algoritmi korral toimub lisaks geenide ristamisele ja mutatsioonidele ka valitud järglaste hulgas väikese sammuga (0.2 Å translatoorseks nihkeks ning 5° orientatsiooniliste ja torsiooni nurkade muutuseks) energia lokaalne minimeerimine.

Järgnevalt mõõdeti eksperimentaalselt parimate molekulaarsildamise tulemustega ühendite inhibeerivat toimet CHIKV nsP2 ensüümi reaktsioonile.

### 3.2. Eksperimentaalne osa

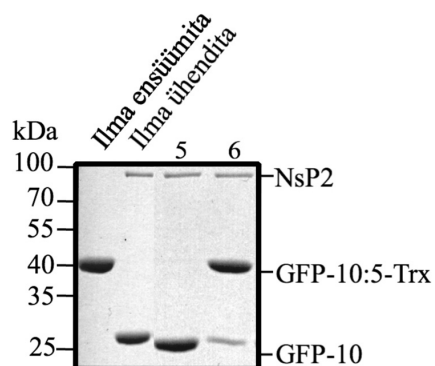
#### CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimine

CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimist uuriti käesolevas töös geelelektroforeesi (SDS-PAGE) meetodil. Kõigepealt viidi läbi proteaasi reaktsioon substraadiga, nsP1/2 ühinemissaidiga EGFP 10ah:5ah Trx, millest EGFP on 10 aminohappeline fluorestseeruv osa nsP1 valgust ning Trx 5 aminohappeline osa nsP2 proteaasist. Reaktsioonisegusse lisati 0.7  $\mu$ M rekombinantset ensüümi, 6  $\mu$ M substraati HEPES puhvris (10mM HEPES[pH7.2] ja 1 mM  $\beta$ -merkaptotetanool) ning uuritavat ühendit DMSO lahuses (1 mM ühendit 10% DMSO). Reaktsioonisegu kogu ruumala oli 8  $\mu$ l. Seejärel lasti reaktsioonil toimuda 30°C juures 60 minutit. Peale reaktsiooni läbiviimist lisati segule naatriumdodetsüülsulfaati (SDS), et lagundada kõrgemat järku struktuurid ning anda valkudele negatiivne laeng. Seejärel pandi reaktsioonisegu geeli süvenditesse ning asetati elektrivälja pingega 200V, mille toimele hakkasid valgud massi alusel katoodi poole liikuma. Peale elektroforeesi protsessi lõppemist värviti geelil olevad valgud ning määrati, millisel määral peatasid uuritavad ühendid reaktsiooni. Töös kasutati polüakrüülamiidgeeli, mis moodustub akrüülamiidi ja bisakrüülamiidi polümeriseerumisel. Geel koosneb kahest osast: laadimisgeelist ning eraldusgeelist. Proovid sisestatakse laadimisgeeli osas asuvatesse süvenditesse, kus valgud liiguvad kiirelt elektrivälja mõjul kahe geeli piirpinnale. Selle peamiseks funktsiooniks on saavutada elektroforeesil võimalikult hea lahutuse. Seejärel liiguvad proovid edasi eraldusgeelil, mille ülesandeks on eraldada valgud massi alusel.

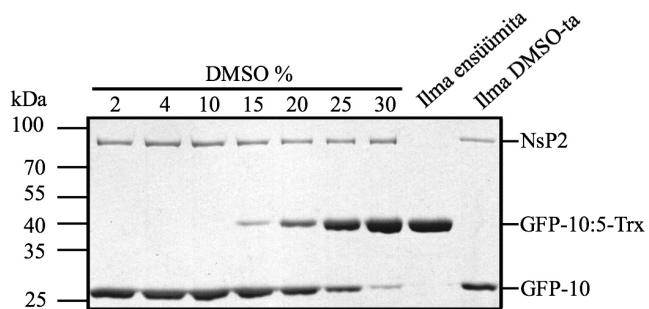
Kui elektroforees on sooritatud, siis värviti geeli Coomassie briljantsinisega, mille põhiliseks ülesandeks on teha valgud geeli pinnal nähtavaks ning kinnitada need paigale. Saadud elektroforeesi pilt on näitena toodud joonisel 4. Elektroforegrammil olevad laigud tähistavad ülalt alla: nsP2 proteaas, substraat GFP-10:5-Trx ja produkt ehk GFP-10. CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimise korral lisatud ühendi poolt jääb substraadi laik muutumatuks, puudub aga produktidele vastav laik. Selleks, et uurida DMSO võimalikku mõju reaktsioonile, teostati reaktsioon vastavalt erinevatel DMSO



kontsentratsioonidel ning leiti, et parim DMSO sisaldus on 10 %. DMSO mõju reaktsioonile on toodud joonisel 5.



Joonis 4. Chikungunya viiruse nsP2 proteaasi inhibeerimise detekteerimiseks kasutatud elektroforegramm.

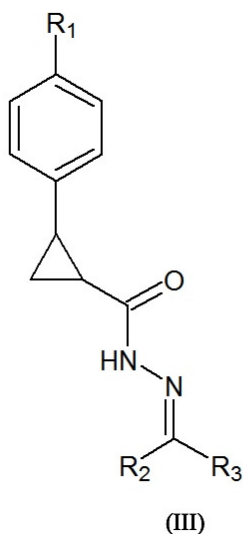


Joonis 5. DMSO mõju elektroforegramm.

## 4. TULEMUSED JA ARUTELU

### 4.1. Ülesande püstitus ja hüpotees

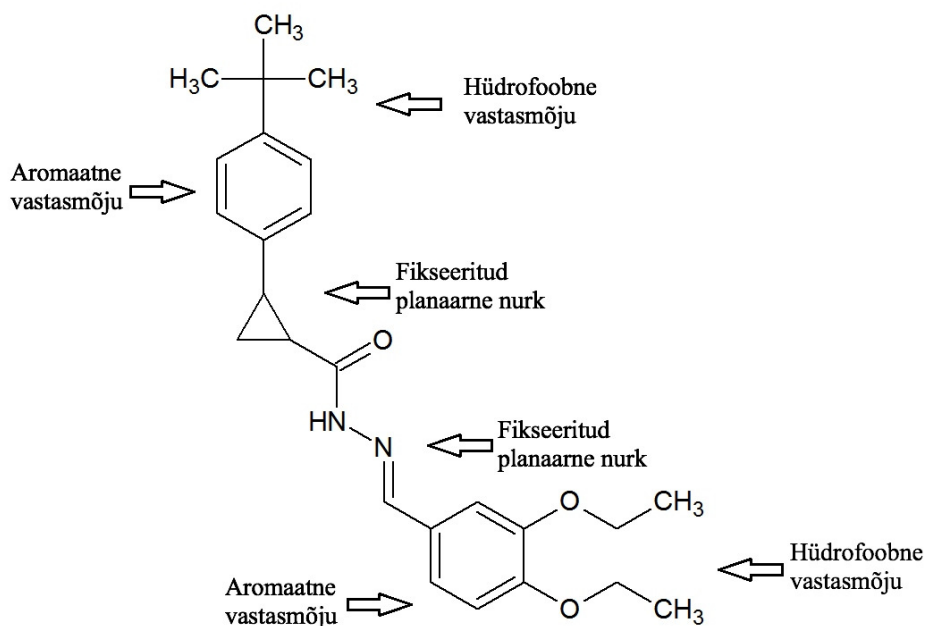
Käesolevas töös oli eesmärgiks leida uued CHIKV proteaasi inhibiitorid, lähtudes olemasolevatest ühenditest, mida on kirjanduses välja pakutud inhibeerimaks uuritavat viirust. Selleks kasutati meetodeid, mis on standardsed seda laadi bioloogiliste süsteemide uurimisel. Töös võeti arvesse varasemalt tuntud ühendite eksperimentaalselt mõõdetud aktiivsus ja struktuur (Tabel I lisas). Kirjanduses avaldatud andmete analüüsimisel selgus, et kõigil juhtudel oli mõõdetud inhibiitorite summaarset aktiivsust viirusele. Suuremad andmekogud olid välja toodud kahes artiklis<sup>[10][21]</sup>, millest võeti aluseks Bassetto jt. töö<sup>[10]</sup>. Selles töös oli välja pakutud hüpotees, et inhibeerivad ühendid mõjuvad nsP2 valgule ning olid kirjeldatud üldise struktuuriga:



Käesolevas töös tehti eeldus, et lähtuvalt eelmainitud struktuurist saaks tuletada uusi aktiivseid ühendeid, mis mõjuksid inhibeerivalt CHIKV proteaasile. Selleks koostati artiklis<sup>[10]</sup> toodud aktiivse ühendi BAS1 struktuurist lähtudes võimalike uute ühendite farmakofoorne iseloomustus (vt. joonis 4).

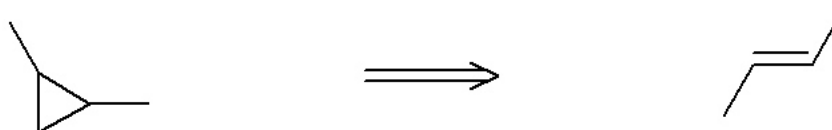
Lähteühendi BAS1 tugistruktuuris on kaks fikseeritud planaarseid nurka, esimene neist on fikseeritud *cis*- või *trans*- asendusena tsüklopropüülrühma juures ning teine samuti

*cis*- või *trans*- asendusena –CH=N sideme juures. Tugistruktuuri hõlmati ka tsüklopropüülrühmaga seotud fenüülrühm, mis koos võimalike asendusrühmadega

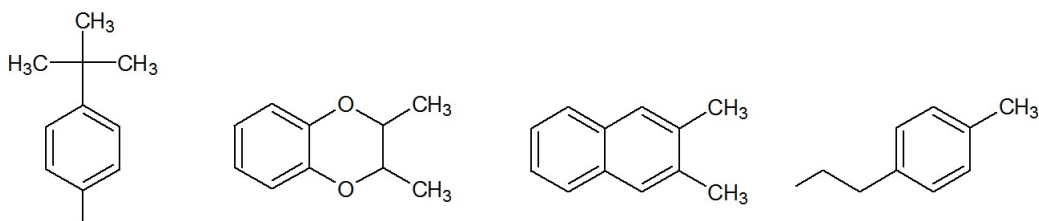


Joonis 4. Lähteühendi BAS1 farmakofoorne iseloomustus.

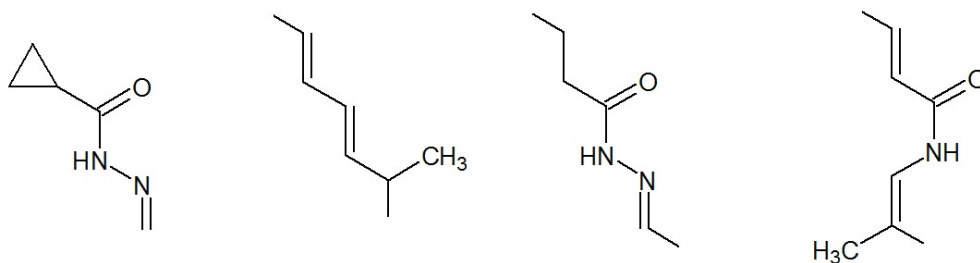
vastutab potentsiaalsete hüdrofoobsete (lipofiilsete) vastasmõjude eest ensüümiga. Tugistruktuuris paiknevad heteroaatomid (O ja N) on potentsiaalsed vesiniksideme aktseptorid vastasmõjus ensüümiga. Tugistruktuuri –CH=N sidemega on samuti seotud suhteliselt hüdrofoobne 3,4-dietoksüfenüülrühm, mis sisaldab ka potentsiaalsete vesiniksideme aktseptoritena hapniku aatomeid. Farmakofoorsete asendustena vaadeldi erinevaid hüdrofoobseid ning vesiniksideme aktseptorina toimivaid asendusrühmi nii tsüklopropüülrühma kui ka –C=N sideme juures. Lisaks vaadeldi täiendavalt tugistruktuuri, milles tsüklopropüülrühm oli asendatud C=C kaksiksidemega.



Tüüpiliste kasutatud asendusrühmade ja tugistruktuuride näited on toodud vastavalt joonistel 5 ja 6.



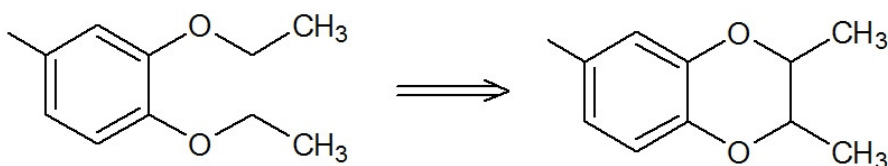
Joonis 5. Tüüpilised asendusrühmad lähteühendi BAS1 struktuuri modifitseerimisel.



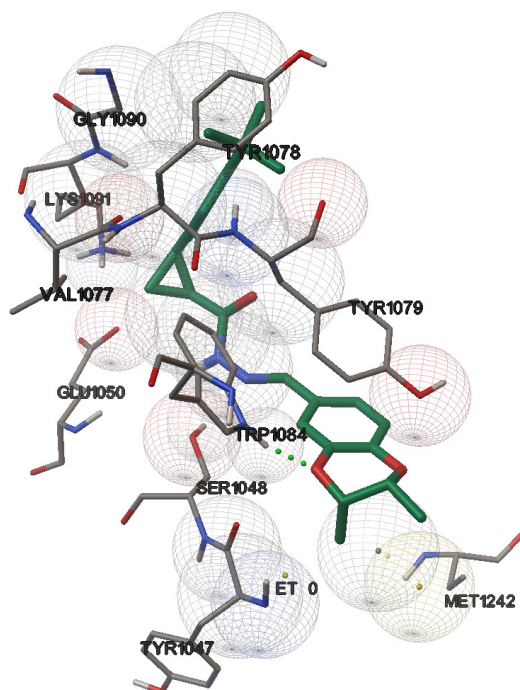
Joonis 6. Parimate molekulaarsildamise sidumise vabaenergiatega tugistruktuurid.

Tulemusena saadi 60 uue struktuuriga ühendit, millele teostati molekulaarsildamine CHIKV nsP2 proteaasi (PDB:3RTK) eeldatavasse aktiivsesse saiti kasutades Autodock 4.2 programmi. Parimad arvutustulemused (sildamise vaba energia  $\Delta G$  ja sildamise efektiivsus  $LE = \Delta G/N_{\text{masked aatomid}}$ ) on toodud tabelis 1.

Molekulaarsildamine näitas, et, et enim positiivset mõju avaldas hüdrofoobsete rühmade asendamine, aga olulist rolli mängis ka tsüklopropüülrühma olemasolu molekulis. Parima tulemuse andis 3,4-dietoksüfenüülrühmas etoksüühemete vahele sideme ehitamine



Taoliselt asendatud ühendi molekulaarsildamise CHIKV nsP2 eeldatavas aktiivses saidis on toodud joonisel 7.

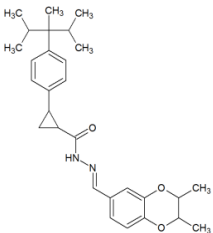
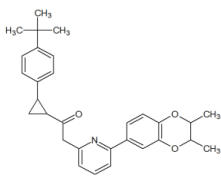
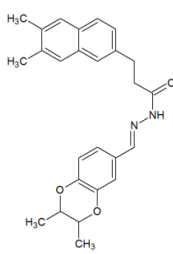
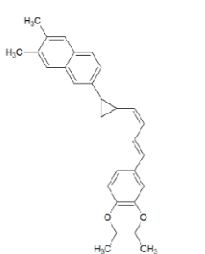
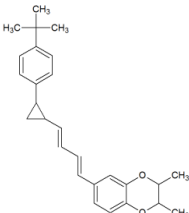
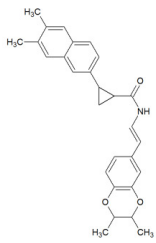


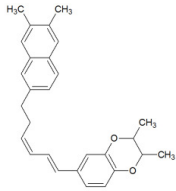
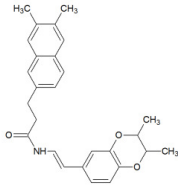
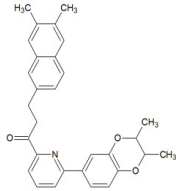
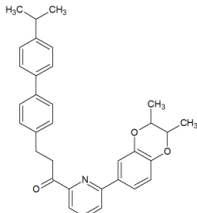
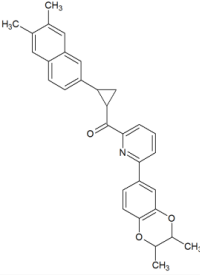
Joonis 7. Ühendi (2-(4-tert-butüülfenüül)-N'-[(1E)-(2,3-dimetüül-2,3-dihüdro-1,4-bensoedoksiin-6-üül)metülideen]tsüklopropan-1-karbohüdriid)'i molekulaarsildamine CHIKV nsP2 eeldatavasse aktiivsesse saiti.

Tabel 1.

Ühendi BAS1 farmakofoorisel modifitseerimisel saadud parima sildamise vabaenergia  $\Delta G$  (kcal/mol) ja sildamise efektiivsusega LE potentsiaalsed CHIKV proteaasi inhibiitorid.

Ühendi kood	Ühendi struktuur	Raskeid aatomeid	$\Delta G$ , kcal/mol	LE
BASa		32	-8.89	-0.278

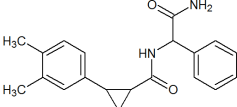
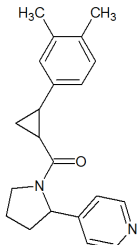
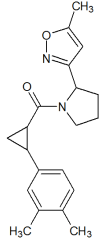
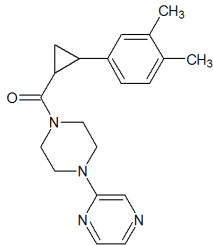
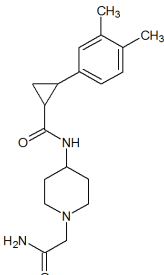
BASb		32	-8.10	-0.253
BASc		34	-8.32	-0.245
BASd		31	-8.78	-0.283
BASE		31	-8.42	-0.272
BASf		29	-8.14	-0.281
BASg		32	-8.52	-0.266

BASh		30	-9.07	-0.302
BASi		31	-8.30	-0.268
BASj		34	-8.75	-0.257
BASj		37	-8.26	-0.223
BASj		35	-9.06	-0.259

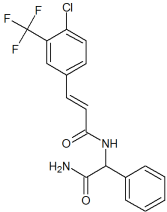
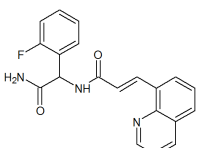
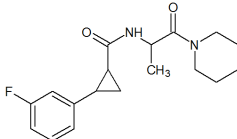
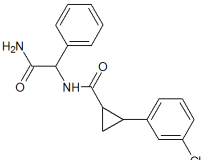
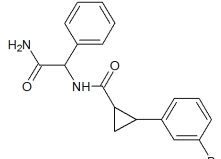
Lähtudes aktiivse ühendi BAS1 farmakofoorse iseloomustamise teel leitud ühenditest ning molekulaarsildamise tulemustest, teostati andmebaaside ZINC<sup>[15]</sup> ning MolPort<sup>[14]</sup> virtuaalne sõelumine vastavalt alamstruktuuri otsingutele. Leiti 70 ühendit, mis võiksid olla CHIKV proteaasi inhibiitoriteks. Neile ühenditele viidi taas läbi molekulaarsildamine nsP2 proteaasi aktiivsesse saiti. Parima sildamise vabaenergia ja sildamise efektiivsusega ühendid on toodud tabelis 2.

Tabel 2.

Parima sildamise vabaenergia  $\Delta G$  (kcal/mol) ja sildamise efektiivsusega LE potentsiaalsed CHIKV proteaasi inhibiitorid andmebaasidest ZINC ja MolPort.

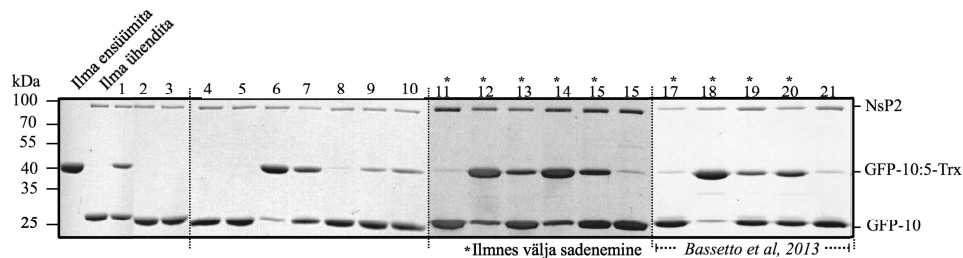
Ühendi kood	Ühendi struktuur	Raskeid aatomeid	$\Delta G$ , kcal/mol	LE
1		24	-7.65	-0.319
2		24	-7.49	-0.312
3		24	-7.41	-0.309
4		25	-7.36	-0.294
5		24	-7.35	-0.306



6		26	-6.53	-0.251
7		26	-7.30	-0.281
8		23	-6.22	-0.270
9		23	-7.04	-0.306
10		23	-7.50	-0.326

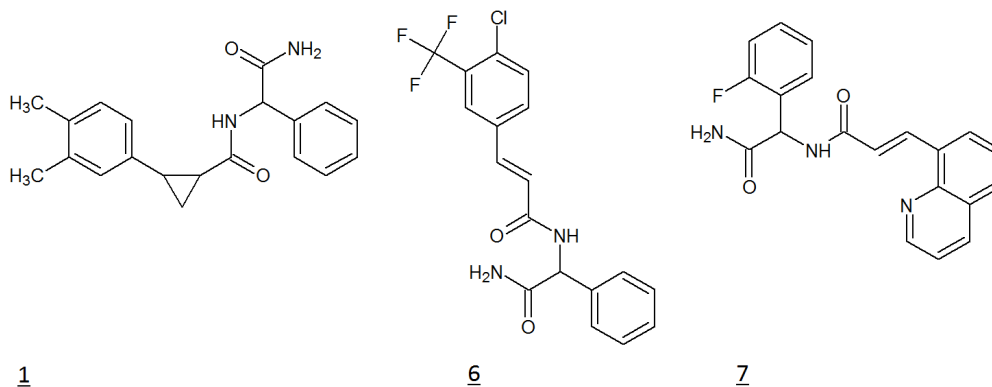
## 4.2. Eksperimentaalsete katsete tulemused

Parima sildamise efektiivsusega ühenditest osteti 16 ühendit ning lisaks 5 artiklis<sup>[10]</sup> toodud ühendit ning teostati nende CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimise aktiivsuse mõõtmised. Elektroforeesil saadud tulemused on toodud joonisel 8.

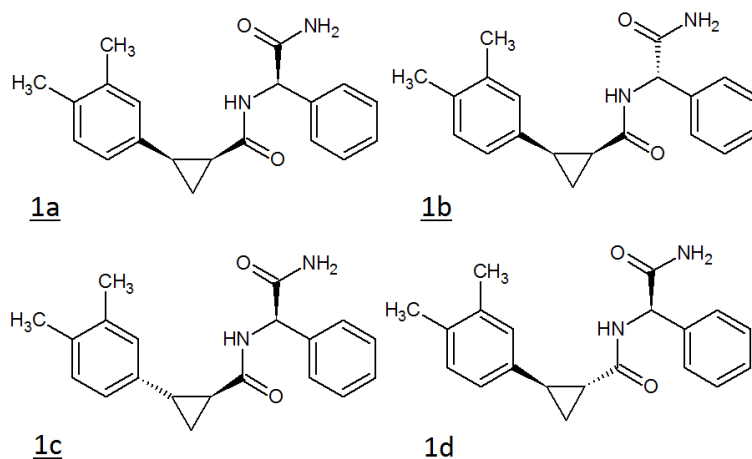


Joonis 8. Potentsiaalsete CHIKV nsP2 proteaasi inhibiitorite aktiivsust iseloomustav elektroforegramm.

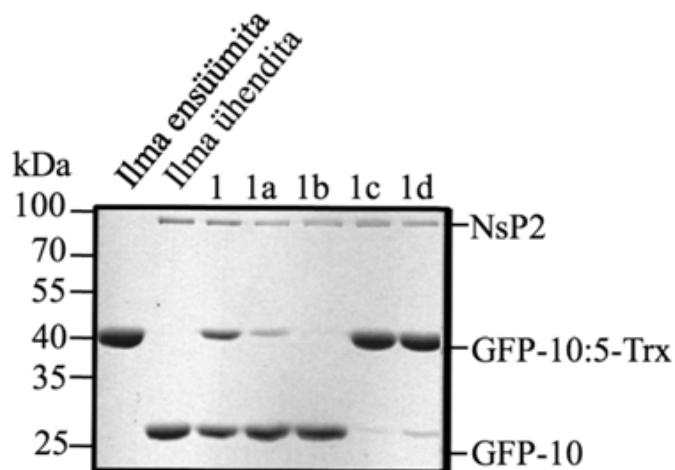
Tulemused näitavad, et enamik ühendeid osutusid inaktiivseteks. Elektroforeesi pildilt on näha, et nende lisamine ei takistanud ensüümi substraadi lagundamist ning substraadile vastav laik on kadunud. Üheksal ühendil esines katsetingimustes väljasadestumine, mistõttu ei olnud võimalik nende aktiivsust usaldusväärselt mõõta. Siiski leidsime, et proteaasile avaldavad selget mõju 3 kommertsiaalselt hangitud ühendit, **1**, **6** ja **7**.



Märkimisväärselt ei õnnestunud ühelgi originaalartiklis <sup>[10]</sup> kirjeldatud ühendil näha inhibeerivat mõju, mis annab alust arvata, et autorite hüpotees, nsP2 proteaasi inhibiitorite leidmisest on osutunud valeks. Sellele vaatamata õnnestus meil üllatavalt käesolevas töös leida uusi CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerivaid ühendeid. Kommertsiaalselt hangitud aktiivseim ühend **1** (2-({[2-(3,4-dimetüülfenüül)]tsüklopropüül}formamido)-2-fenüülatsetamiid) on tegelikult nelja isomeeri segu.



Seetõttu pakkus suurt huvi, milline või millised neist isomeeridest on suurima aktiivsusega. Vastavad isomeerid sünteesiti TTÜ keemiainstituudis professor Margus Loppi laboratooriumis Dzmitry Kazanovichi poolt ning sooritati taas nende CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimise mõõtmised. Sünteesitud ühenditest aktiivseimaks osutus **1c**, vt. joonis 9.



Joonis 9. 2-([2-(3,4-dimetüülfenüül)tsüklopropüül]formamido)-2-fenüülatsetamiidi isomeeride **1a-1d** CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimise aktiivsus, mõõdetuna elektroforeesi abil.

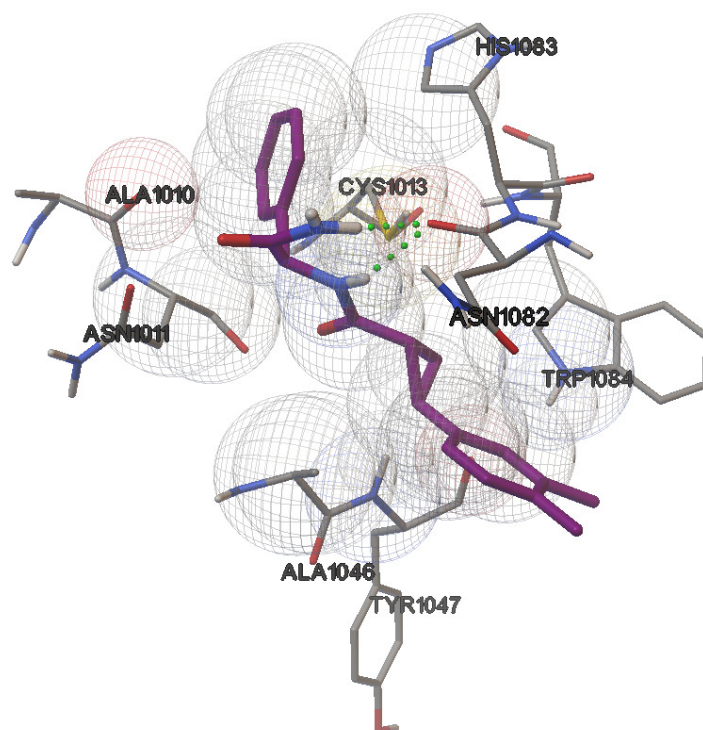
Ühenditele **1a-1d** on teostatud ka viiruse kui terviku inhibeerimise mõõtmised Dr. Tero Ahola uurimisgrupis Soomes (*Division of Microbiology and Biotechnology, Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finny*

Varghese) rakukatsetes. Saadud efektiivsed kontsentratsioonid (EC50) (vt. tabel 3) on kooskõlas meie poolt mõõdetud CHIKV nsP2 proteaasi inhibeerimise aktiivsustega, aga ka molekulaarsildamisel saadud sildamise efektiivsustega, LE.

Tabel 3. CHIKV inhibeerimine rakukatsetes ühendite **1**, **1a-1d** poolt.

Ühend	EC50, μM	ΔG, kcal/mol	LE
<b>1</b>	32,24	-	-
<b>1a</b>	39,42	-8,02	-0,334
<b>1b</b>	>100	-6,65	-0,277
<b>1c</b>	31,49	-7,34	-0,306
<b>1d</b>	56,71	-6,97	-0,290

Ühendi (2-([2-(3,4-dimetüülfenüül)tsüklopropüül]formamido)-2-fenüülatsetamiidi) aktiivseima isomeeri **1c** molekulaarsildamise struktuur on toodud joonisel 10.



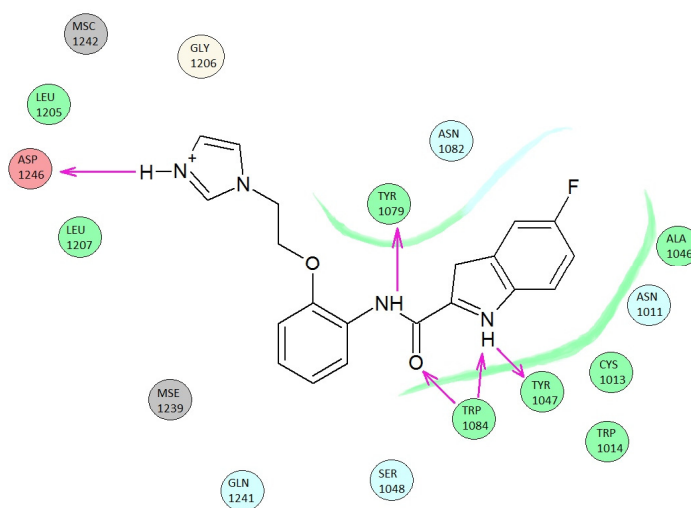
Joonis 10. Ühendi **1c** molekulaarsildamine CHIKV nsP2 proteaasi aktiivsesse saiti.

Jooniselt on näha, et oluliseks interaktsiooniks on inhibiitori molekuli amiidsete N-H vesiniku aatomite ja valgu Asn1082 aminohappe jäägi amiidse hapniku aatomi vahel olevad vesiniksidemed. Aromaatseid asendusrühmad paiknevad vastavalt Cys1013 ja Ala1010 aminohappe jääkidega ning Trp1084 ja Ala1046 jääkidega piirnevas hüdrofoobses alas.

### 4.3. Tuntud aktiivsete ühendite täielik molekulaarsildamise analüüs

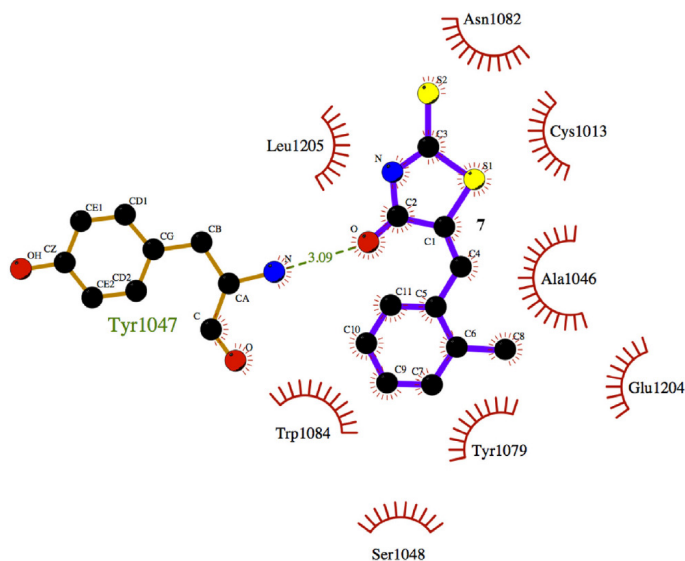
Leidmaks uusi võimalikke CHIKV inhibiitoreid, mis oleksid suunatud konkreetsetele viiruse elutsükliga seotud sihtmärkidele, teostati teadaolevate viiruse inhibiitorite molekulaarsildamine nsP2 proteaasi ning nsP3 valgu võimalikesse aktiivsetesse tsentritesse.

CHIKV nsP2 proteaasil on leitud kaks võimalikku sidumise saiti<sup>[7]</sup>. Esimene neist (**A**) oli kasutusel käesolevas töös uute inhibiitorite molekulaarsildamisel (joonis 11). Sidumiskohas on lokaliseeritud võimalikud vesiniksidemete moodustumised Asp1246, Tyr 1047, Tyr1079 ja Trp1084 aminohappe jääkidega.



Joonis 11. CHIKV nsP2 proteaasi sidumise sait **A**<sup>[7]</sup>.

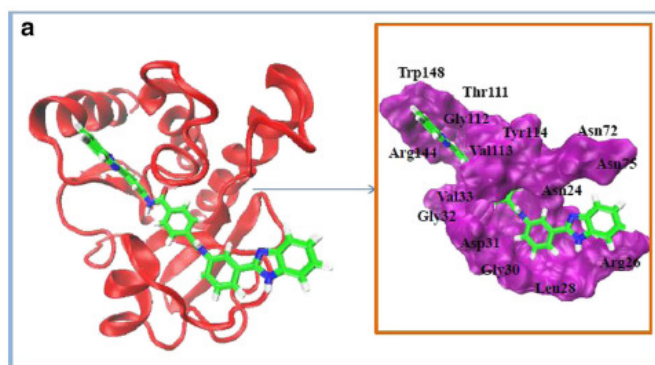
Hiljuti on välja pakutud veel teinegi, üsna lähedane sidumiskoht CHIKV nsP2 proteaasile (**B**)<sup>[22]</sup> (joonis 12).



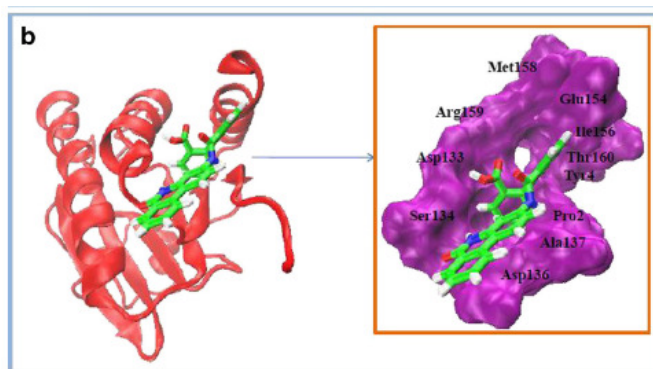
Joonis 12. CHIKV nsP2 proteaasi sidumise sait **B**<sup>[22]</sup>.

Tõenäoliselt helikaasi aktiivsusega CHIKV nsP3 valgule (PDB Code: 3GPG) on välja pakutud kolm erinevat sidumise sait<sup>[11]</sup>. Neist esimene, märklaud **C** on ADP-riboosiga sidumise sait, mis asub Arg26, Gly32, Asn72 ja Trp148 aminohappe jääkidega piirnevas alas, (joonis 13).

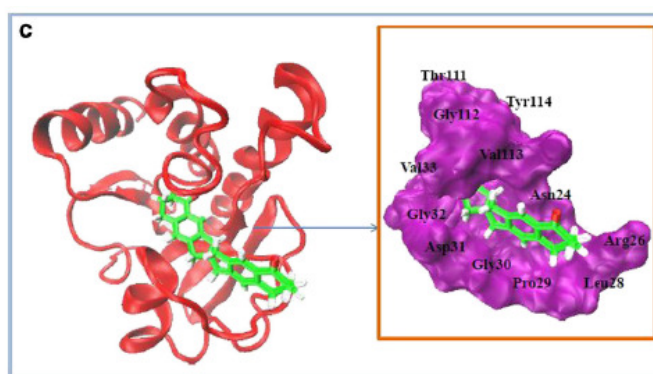
Kaks täiendavat märklauda olid leitud pimesildamise teel. Neist esimesel juhul (**D**, joonis 14) oli molekulaarsildamisel griidikast lokaliseeritud ADP-riboosi sidumise saidi keskpunkti, teisel juhul (**E**, joonis 15) aga valgu keskpunkti.



Joonis 13. Märklaud **C** CHIKV nsP3 valgu struktuuris<sup>[11]</sup>.



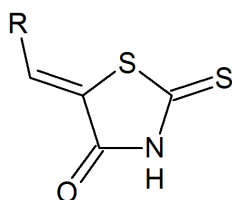
Joonis 14. Märklaud **D** CHIKV nsP3 valgu struktuuris<sup>[11]</sup>.



Joonis 15. Märklaud **E** CHIKV nsP3 valgu struktuuris<sup>[11]</sup>.

Programmi Autodock 4.2 abil teostati 50 teadaoleva madalmolekulaarse CHIKV inhibiitori molekulaarsildamine kõigisse ülaloodud märklaudadesse, kasutades AMBER'i jõuvälja ning Lamarcki geneetilist optimeerimise algoritmi. Arvutatud sildamise vabaenergiad  $\Delta G$  ning efektiivsused LE on toodud käesoleva töö lisa tabelites II ja III.

Enamiku ühendite korral jäi sidumise efektiivsus kas madalaks või siis keskpäraseks ( $LE > -0.4$ ). Erandiks on väike seeria tiasolidiini derivaate<sup>[22]</sup>.



mille  $LE < -0.4$ . Parim sidumine oli nsP3 märklauaga **E**, ulatudes kuni  $LE = -0.490$  ning NsP2 proteaasi märklauaga **A**, mille korral maksimaalne  $LE = -0.467$ . Aktiivsed ühendid on ka madala molekulmassiga ( $MW < 300$ ), mistõttu asendatud tiasolidiinid ning analoogsed heterotsüklilised süsteemid võivad osutada suurt huvi pakkuvateks edasistel CHIKV ravimikandidaatide otsingutel.



## 5. KOKKUVÕTE

Käesolevas töös otsiti uusi CHIKV inhibiitoreid, võttes bioloogiliseks märklauaks viiruse proteaasi. Selleks lähtuti olemasoleva potentsiaalse CHIKV nsP2 inhibiitori BAS struktuurist ning modifitseeriti seda farmakofoorsete asendustega. Saadud uute ühendite aktiivsust hinnati molekulaarsildamise abil nsP2 kristallstruktuurile ning sellest lähtudes leiti sidumist oluliselt parandavad struktuursed faktorid. Neist tulemustest lähtudes teostati suurte ühendite andmebaaside ZINC ja MolPort virtuaalne sõelumine ning taaskordse molekulaarsildamisega tehti kindlaks parima sidumise ühendid. Viimased hangiti kommertsiaalsetest allikatest ning teostati nende CHIKV nsP2 proteaasi aktiivsuse inhibeerimise katsed *in vitro* tasemel. Eksperimentaalsed tulemused näitasid 3 täiesti uue ühendi suurt inhibeerivat aktiivsust, parim neist võib osutuda piisavalt heaks kandidaadiks minemaks *in vivo* loomkatsetele.

Töö käigus teostati ka molekulaarsildamine 50 teadaolevale Chikungunya viiruse inhibiitorile viie erineva märklaua suhtes. Kaks neist asuvad nsP2 proteaasi, kolm aga nsP3 valgu struktuuris. Enamikel juhtudel jäi sidumise efektiivsus madalaks, mis viitab sellele, et nende inhibiitorite toime mehhanism on seotud mingite teiste viiruse elutähtsate sihtmärkidega. Parimaid tulemusi andsid mõningad tiasolidiini derivaadid ning seetõttu võivad analoogsed heterotsükliilised süsteemid osutuda suur huvi pakkuvateks edasistel CHIKV ravimikandidaatide otsingutel.

## 6. SUMMARY

### Design and testing of the first Chikungunya virus protease inhibitors

The aim of this thesis was to develop new CHIKV inhibitors acting on its biological target nsP2 protease. By emanating from known CHIKV inhibitor BAS1 structure, modifications using pharmacophore approach were applied for finding new leading compounds. New modified compounds were evaluated using molecular docking to nsP2 crystal structure and according to the binding energy, structural factors for better binding were found. Relied on the previous results, virtual screening on MolPort and ZINC compound libraries was applied and evaluated by molecular docking for finding compounds that have the best binding energy. The best compounds were acquired from commercial sources and *in vitro* CHIKV nsP2 protease inhibitory activity experiments were carried out. Experimental results showed significant inhibitory activity for 3 novel compounds, from which the best compound might turn out to be sufficiently good candidate for further *in vivo* animal tests.

In the present study, molecular docking was also applied for 50 known Chikungunya virus inhibitors at five different binding sites. Two of those sites were located in nsP2 protease structure and three in nsP3 protein structure. In most cases, binding efficiency was rather low, suggesting that the activity mechanism of these inhibitors might be involved with other vital virus targets. The best results were noted by some thiazolidine derivatives, therefore similar heterocyclic systems might form interesting base for further CHIKV drug candidate search.

## TÄNUVALDUSED

Autor tänab professor Andres Meritsat, Pratyush Kumar Dasi ja Age Utti TÜ tehnoloogiainstituudist sujuva koostöö eest eksperimentaalsetel katsetel läbiviimisel; Tero Aholat ja Finny Vargheset Helsingi ülikoolist rakukatsete teostamise eest; professor Margus Loppi ja Dzmitry Kazanovichit TTÜ keemiainstituudist ühendite isomeeride sünteesimise eest.

## 7. KASUTATUD KIRJANDUS

1. Lo Presti, A.; Lai, A.; Cella, E.; Zehender, G.; Ciccozzi, M., Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2014, **7**, 925-932.
2. Couderc, T.; Khandoudi, N.; Grandadam, M.; Visse, C.; Gangneux, N.; Bagot, S.; Prost, J.F.; Lecuit, M., Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection, *J. Infect. Dis.*, 2009, **200**, 516-523.
3. Thiberville, S.-D.; Moyen, N.; Dupuis-Maguiraga, L.; Nougairede, A.; Gould, E.A.; Roques, P.; de Lamballerie, X., Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy, *Antivir. Res.*, 2013, **99**, 345–370.
4. Bhakat, S; Karubiu, W; Jayaprakash, V; Soliman, ES, A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **87**, 677-702.
5. Rashad, A.A.; Mahalingam, S.; Keller P.A., Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 1147–1166.
6. Parashar, D.; Cherian, S., Antiviral Perspectives for Chikungunya Virus, *BioMed Research International*, 2014, 631642.
7. Jadav, S.S.; Jayaprakash, V.; Basu, A.; Sinha, B.N., Chikungunya Protease Domain–High throughput Virtual Screening, *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 2012, **72**, 1765-1768.
8. Irwin, J.J.; Shoichet, B.K., ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.*, 2005, **45**, 177-182.
9. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood, J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6177–6196.
10. Bassetto, M.; De Burghgraeve, T.; Delang, L.; Massarotti A.; Coluccia A.; Zonta, N.; Gatti, V.; Colombano, G.; Sorba, G. Silvestri, R.; Tron, G.C.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Brancale, A., Computer-aided identification, design and

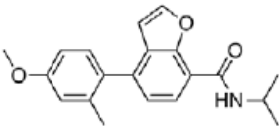
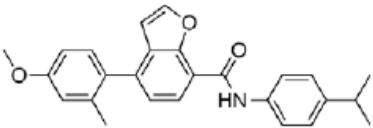
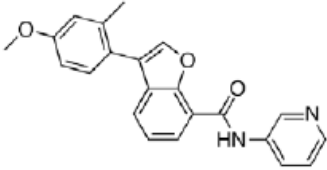
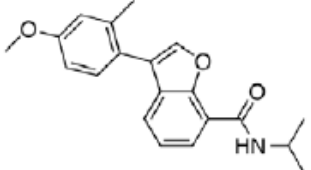
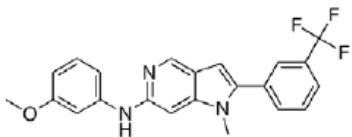
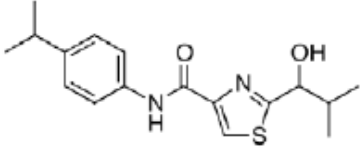
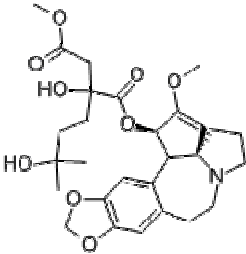
- synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against chikungunya virus, *Antivir. Res.* 2013, **98**, 12-18.
11. Nguyen, P.T.V.; Yu, H.; Keller, P.A., Discovery of in silico hits targeting the nsP3 macro domain of chikungunya virus, *J. Mol. Model.*, 2014, **20**, No.2216.
  12. Rashad, A.A.; Keller, P.A., Structure based design towards the identification of novel binding sites and inhibitors for the chikungunya virus envelope proteins, *J. Mol. Graph. Model.*, 2013, **44**, 241-252.
  13. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K., Goodsell, D.S.; Olson, A.J., Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009, **16**, 2785-2791.
  14. SIA MolPort, Lāčplēša iela 41, Rīga, LV-1011, Latvija.
  15. Irwin, J.J.; Sterling, T.; Mysinger, M.M.; Bolstad, E.S., Coleman R.G., ZINC: a free tool to discover chemistry for biology, *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, **57**, 1757-1768.
  16. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E., The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**, 235-242. ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).
  17. Rocha, G.B.; Freire, R.O.; Simas, A.M.; Stewart, J.J.P., RM1: a Reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, *J. Comput. Chem.*, 2006, **27**, 1101-1111.
  18. Autodock 4.2, User's Guide, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, 2012.
  19. Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M. Jr.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A., A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, **117**, 5179–5197.
  20. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J., Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, *J. Comput. Chem.*, 1998, **19**, 1639-1662.
  21. Gigante, A.; Canela, M.D; Delang, L.; Priego, E.M.; Camarasa, M.J.; Querat, G.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Perez-Perez, M.J., Identification of [1,2,3] Triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones as Novel Inhibitors of Chikungunya Virus Replication, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 4000-4008.

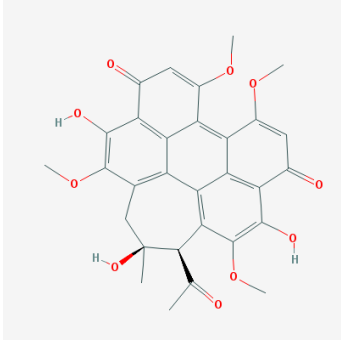
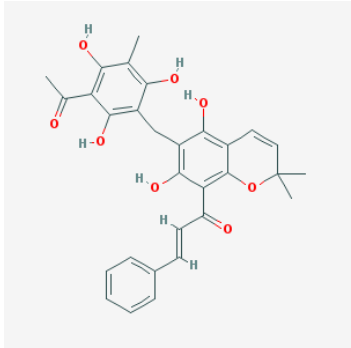
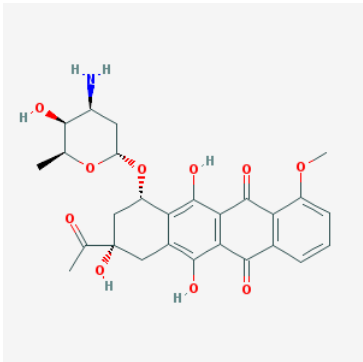
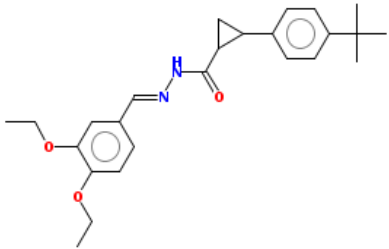
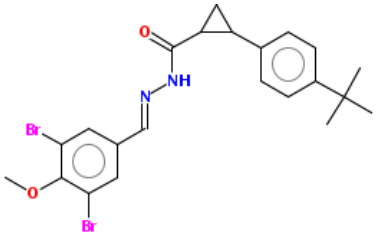
22. Jadav, S.S; Sinha, B.N.; Hilgenfeld,R.; Pastorino, B.; de Lamballerie, X.; Jayaprakash, V., Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **89**, 172-178.
23. Cruz, D.J.M.; Bonotto, R.M.; Gomes, R.G.B.; da Silva, C.T.; Taniguchi, J.B.; No, J.H.; Lombardot, B.; Schwartz, O.; Hansen, M.A.E. ; Freitas, L.H., Identification of Novel Compounds Inhibiting Chikungunya Virus-Induced Cell Death by High Throughput Screening of a Kinase Inhibitor Library, *PLOS Negl. Tropic. Dis.*, 2013, No. e2471.
24. Kaur, P.; Thiruchelvan, M.; Lee, R.C.H.; Chen, H.X.; Chen, K.C.; Ng, M.L.; Chu, J.J.H., Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, **57**, 155-167.
25. Corlay, N.; Delang, L.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J. (; Clerc, P.; Smadja, J. ; Gueritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M., Tiglane diterpenes from *Croton mauritanus* as inhibitors of chikungunya virus replication, *Fitoter.*, 2014, **97**, 87-91 .
26. Lucas-Hourani, .; Lupan, A.; Despres, P.; Thoret, S.; Pamlard, O.; Dubois, J.; Guillou, C.; Tangy, F.; Vidalain, P.O.; Munier-Lehmann, H, A Phenotypic Assay to Identify Chikungunya Virus Inhibitors Targeting the Nonstructural Protein nsP2, *J. Biomol. Screen.*, 2013, **18**, 172-179.
27. Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V.H.; Neyts, J.; Gueritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M., Prostratin and 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication, *J. Nat. Prod.*, 2012, **75**, 2183-2187.
28. Nothias-Scaglia, L.; Retailleau, P.; Paolini, J.; Pannecouque, C.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Roussi, F.; Leyssen, P.; Costa, J.; Litaudon, M., Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure-Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead, *J. Nat. Prod.*, 2014, **77**, 1505-1512.
29. Gupta, D.K.; Kaur, P.; Leong, S.T.; Tan, L.T.; Prinsep, M.R.; Chu, J.J.H., Anti-Chikungunya Viral Activities of Aplysiatoxin-Related Compounds from the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, *Marin. Drugs*, 2014, **12**, 115-127.

30. Bourjot, M.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Dumontet, V.; Litaudon, M., Trigocherrierin A, a Potent Inhibitor of Chikungunya Virus Replication, *Molecules*, 2014, **19**, 3617-3627.
31. Pohjala, L.; Utt, A.; Varjak, M.s; Lulla, A.; Merits, A.; Ahola, T.; Tammela, P., Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays, *PLOS One* 2011, **6**, No. e28923.
32. Mudhasani, R.; Kota, K.P.; Retterer, C.; Tran, J.P.; Tritsch, S.R.; Zamani, R.; Whitehouse, C.A.; Bavari, S, High-Content Image-Based Screening of a Signal Transduction Pathway Inhibitor Small-Molecule Library against Highly Pathogenic RNA Viruses, *J. Biomol. Screen.*, 2015, **20**, 141-152.

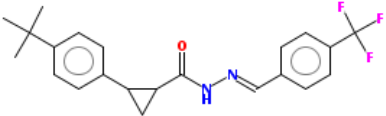
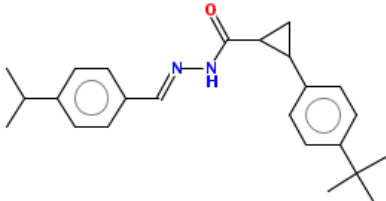
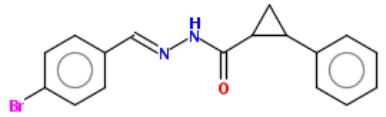
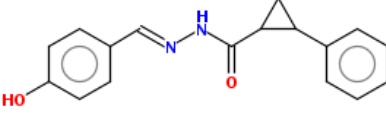
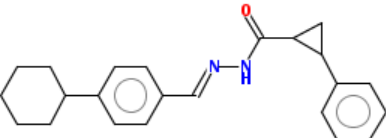
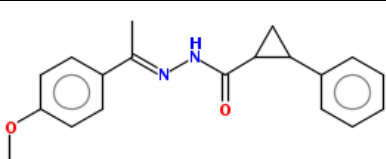
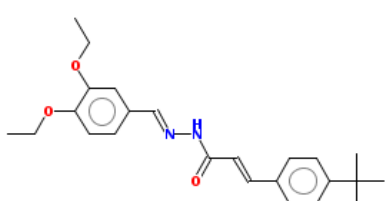
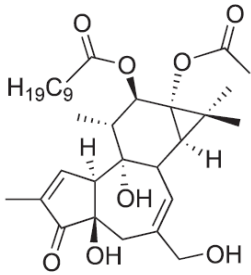
## 8. LISAD

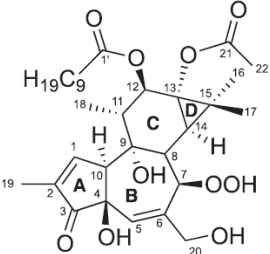
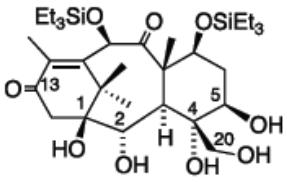
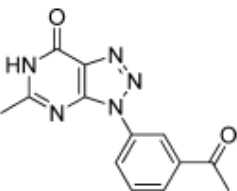
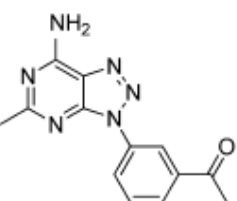
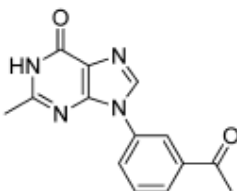
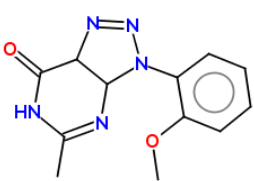
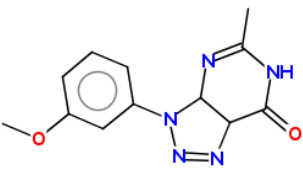
Tabel I. Chikungunya viiruse inhibiitorid (kirjanduse ülevaade 20.05.2015.)

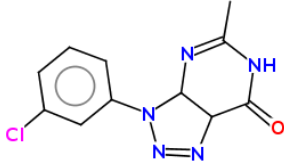
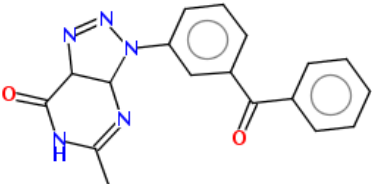
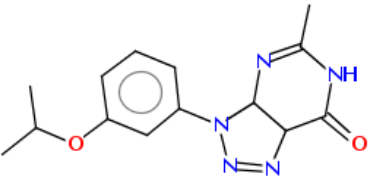
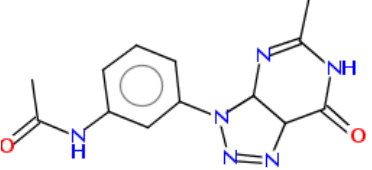
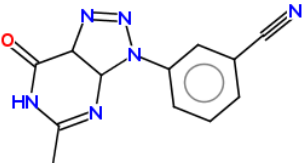
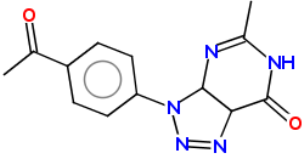
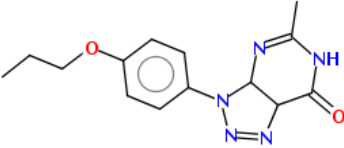
Ühendi kood/nimi	Keemiline struktuur	Meetod	IC50(EC50) $\mu$ M	Viide
CND0335		Rakupõhine test reasuriiniga	3.3	[23]
CND0364		Rakupõhine test reasuriiniga	6.2	[23]
CND0366		Rakupõhine test reasuriiniga	6.2	[23]
CND0415		Rakupõhine test reasuriiniga	7.1	[23]
CND0545		Rakupõhine test reasuriiniga	5.6	[23]
CND3514		Rakupõhine test reasuriiniga	2.2	[23]
Harringtonine		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	0.24	[24]

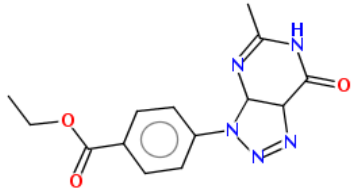
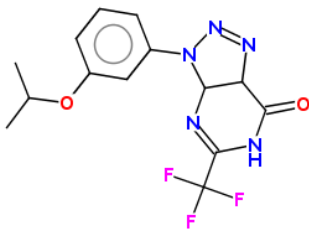
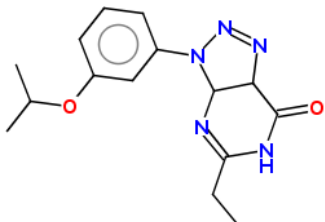
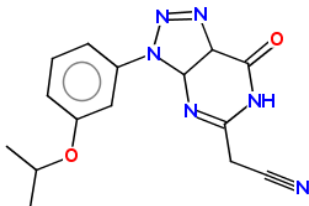
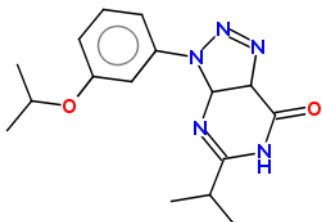
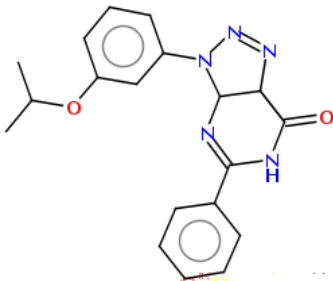
Hypocrellin A		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	1.0	[24]
Rottlerin		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	>10	[24]
Daunorubicin		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	>10	[24]
BAS 1		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	5.0	[10]
BAS 2		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	4.0	[10]

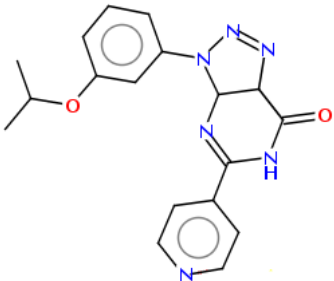
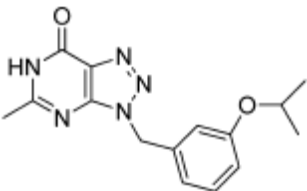
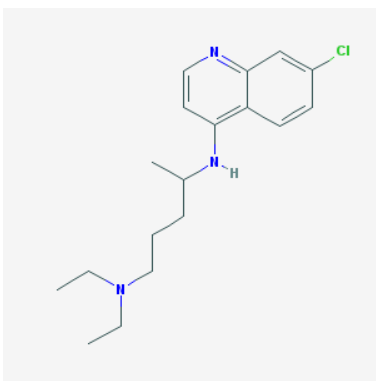
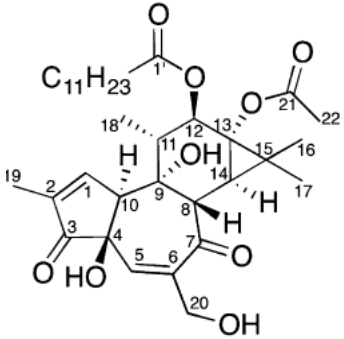
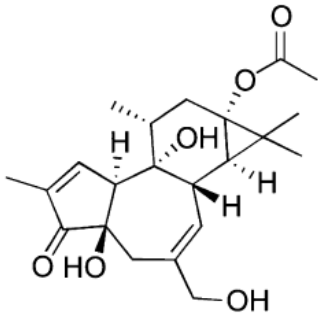


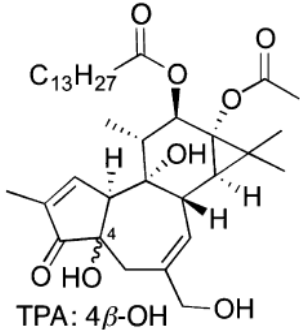
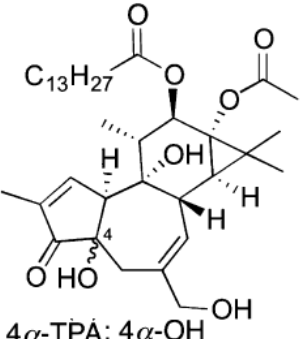
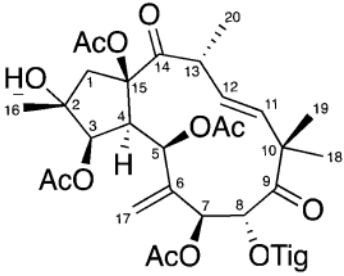
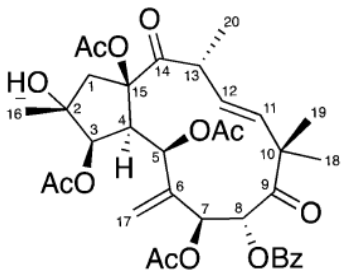
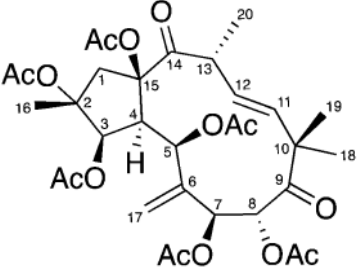
BAS 4		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	14	[10]
BAS 8		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	3.6	[10]
BAS 10		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	24	[10]
BAS 11		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	6.4	[10]
BAS 12		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	32	[10]
BAS 13		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	12	[10]
BAS 25		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	3.2	[10]
COR 1		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	2.4	[25]

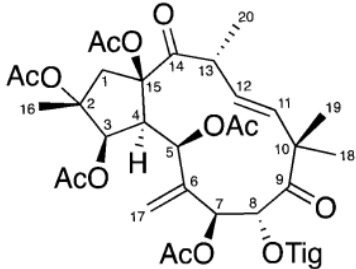
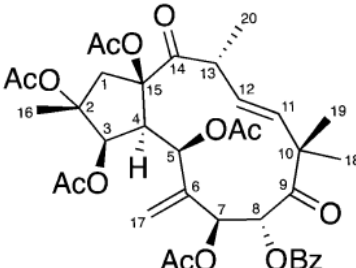
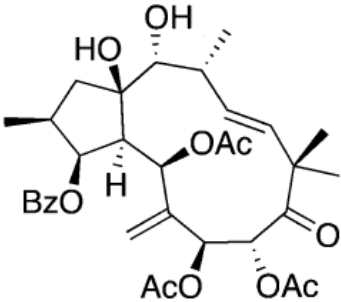
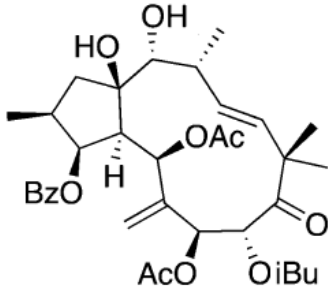
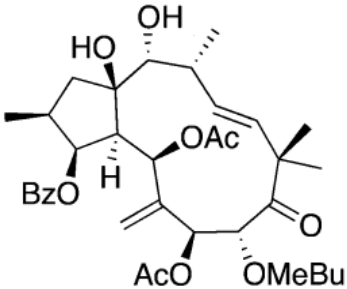
COR 2		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	4.0	[25]
ID1452-2		CHIKV inhibeerimine inimese HEK-293T rakkudes	31	[26]
GIG 2		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	19	[21]
GIG 3a		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	225	[21]
GIG 6a		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	127	[21]
GIG 11a		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	348	[21]
GIG 11b		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	28	[21]

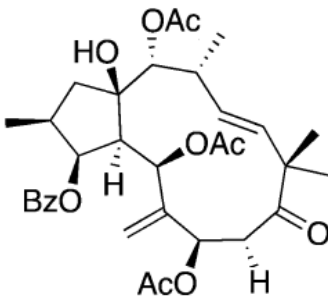
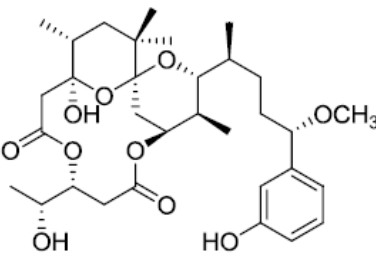
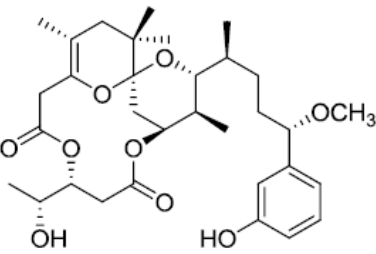
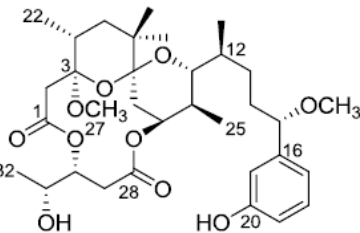
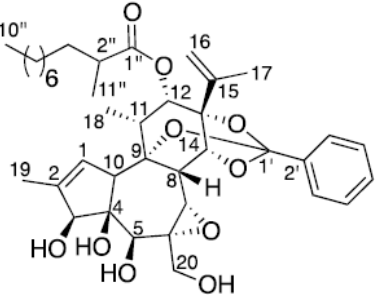
GIG 11c		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	32	[21]
GIG 11d		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	23	[21]
GIG 11e		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	12	[21]
GIG 11f		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	318	[21]
GIG 11h		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	131	[21]
GIG 11j		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	326	[21]
GIG 11k		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	169	[21]

GIG 11m		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	202	[21]
GIG 15a		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	68	[21]
GIG 15b		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	3	[21]
GIG 15c		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	115	[21]
GIG 15e		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	280	[21]
GIG 15f		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	204	[21]

GIG 15g		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	75	[21]
GIG 20		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	167	[21]
Chloroquine		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	11	[21]
Trigowiin A		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	43.5	[27]
Prostratin		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	2.6	[27]

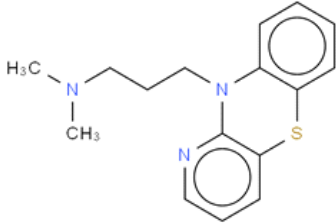
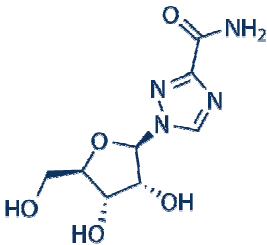
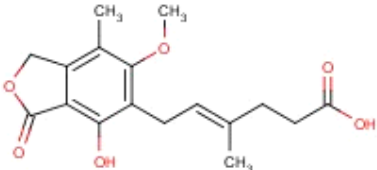
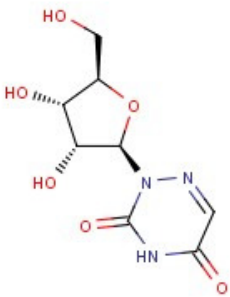
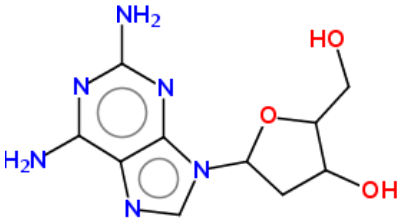
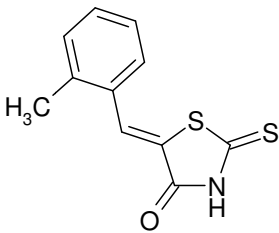
TPA	 <p>TPA: 4β-OH</p>	CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	0.0029	[27]
4α-TPA	 <p>4α-TPA: 4α-OH</p>	CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	2.8	[27]
NOT 3		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	0.76	[28]
NOT 4		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	4.3	[28]
NOT 5		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	60	[28]

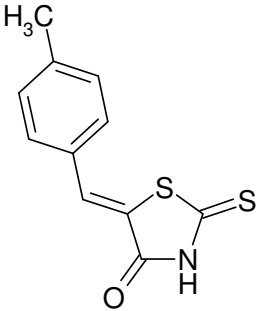
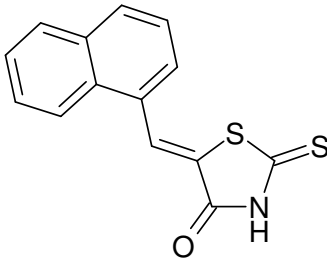
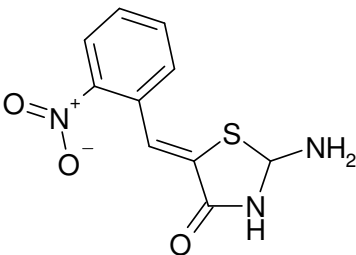
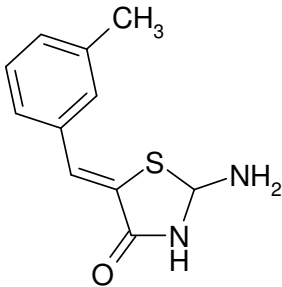
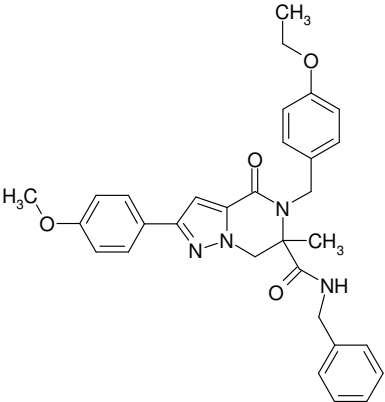
NOT 6		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	17.4	[28]
NOT 7		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	17.1	[28]
NOT 8		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	19.5	[28]
NOT 9		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	21.0	[28]
NOT 10		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	111	[28]

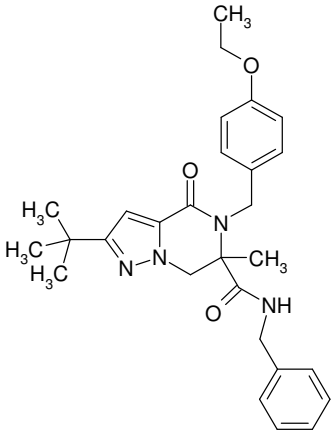
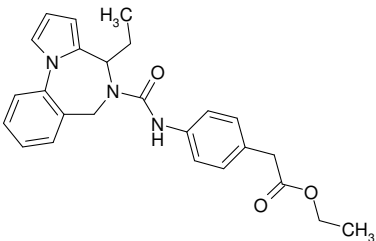
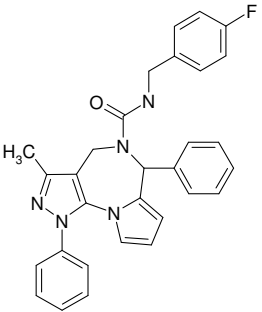
NOT 11		CHIKV tüve 899 inhibeerimine Vero rakkudes	80	[28]
Debromo- aplysiatoxin 2		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	1.3	[29]
Anhydrodebrom- o-aplysiatoxin 3		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	22.3	[29]
3-Methoxydebrom- o-aplysiatoxin 5		CHIKV inhibeerimine BHK21 rakkudes	2.7	[29]
Trigocherrierin A 1		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	0.6	[30]



Trigocheriolide E 2		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	0.7	[30]
Apigenin		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	22.5	[31]
Chrysin		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	46.8	[31]
Narigenin		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	25.8	[31]
Silybin		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	71.1	[31]

Prothipendyl		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	135.0	[31]
Ribavirin		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	8.8	[31]
Mycophenolic acid		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	1.5	[31]
6-Azaauridine		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	2.4	[31]
3'-NH <sub>2</sub> -3'-deoxyadenosine		CHIKV inhibeerimine BHK-CHIKV- NCT rakkudes	34.0	[31]
JAD7		CHIKV tüve LR2006_OPY1 inhibeerimine Vero rakkudes	0.42	[22]

JAD8		CHIKV tüve LR2006_OPY1 inhibeerimine Vero rakkudes	4.2	[22]
JAD9		CHIKV tüve LR2006_OPY1 inhibeerimine Vero rakkudes	3.6	[22]
JAD16		CHIKV tüve LR2006_OPY1 inhibeerimine Vero rakkudes	40.1	[22]
JAD19		CHIKV tüve LR2006_OPY1 inhibeerimine Vero rakkudes	6.8	[22]
E225-0969		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	1.9	[32]

E528-0039		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	17.3	[32]
G118-0778		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	62.1	[32]
G544-0735		CHIKV inhibeerimine Vero rakkudes	36.1	[32]

Tabel II. Eksperimentaalselt leitud aktiivsete CHIKV inhibiitorite molekulaarsildamise vaba energiad (kcal/mol) ja sildamise efektiivsused nsP2 proteaasi sidumise saitides **A** ja **B**.

Ühendi kood	Raskeid aatomeid	Sait A, $\Delta G$ , kcal/mol	(A) Sidumise efektiivsus	Sait B, $\Delta G$ , kcal/mol	(B) Sidumise efektiivsus	IC50(EC50), $\mu M$
CND0335	24	-7.47	-0.31	-6.69	-0.28	3.3
CND0364	30	-8.35	-0.28	-8.01	-0.27	6.2
CND0366	27	-8.75	-0.32	-8.71	-0.32	6.2
CND0415	24	-7.81	-0.33	-7.76	-0.32	7.1

CND0545	29	-6.99	-0.24	-7.07	-0.24	5.6
CND3514	22	-6.63	-0.30	-6.87	-0.31	2.2
BAS 1	30	-6.35	-0.21	-7.01	-0.23	5
BAS 2	28	-8.28	-0.30	-9.12	-0.33	4
BAS 4	28	-6.98	-0.25	-7.88	-0.28	14
BAS 8	27	-7.67	-0.28	-7.46	-0.28	3.6
BAS 10	21	-7.18	-0.34	-7.85	-0.37	24
BAS 11	21	-6.66	-0.32	-6.65	-0.32	6.4
BAS 12	26	-8.12	-0.31	-8.01	-0.31	32
BAS 13	22	-7.07	-0.32	-6.71	-0.31	12
BAS 25	29	-6.62	-0.23	-6.28	-0.22	3.2
GIG 2	20	-7.16	-0.36	-7.29	-0.36	19
GIG 3a	20	-7.19	-0.36	-7.05	-0.35	225
GIG 6a	20	-8.02	-0.40	-7.05	-0.35	127
GIG 11a	18	-6	-0.33	-7.02	-0.39	348
GIG 11b	19	-7.24	-0.38	-7	-0.37	28
GIG 11c	18	-7.16	-0.40	-7.43	-0.41	32
GIG 11d	25	-8.46	-0.34	-8.53	-0.34	23
GIG 11e	21	-7.25	-0.35	-7.03	-0.33	12
GIG 11f	21	-7.86	-0.37	-8.14	-0.39	318
GIG 11h	19	-7.56	-0.40	-7.49	-0.39	131
GIG 11j	20	-7.09	-0.35	-7.1	-0.36	326
GIG 11k	21	-7.08	-0.34	-7.16	-0.34	169
GIG 11m	22	-7.22	-0.33	-7.28	-0.33	202
GIG 15a	24	-6.42	-0.27	-6.51	-0.27	68
GIG 15b	22	-7.65	-0.35	-7.87	-0.36	3

GIG 15c	23	-6.84	-0.30	-6.99	-0.30	115
GIG 15e	23	-7.65	-0.33	-7.94	-0.35	280
GIG 15f	26	-7.32	-0.28	-8.22	-0.32	204
GIG 15g	26	-8	-0.31	-7.46	-0.29	75
GIG 20	20	-7.21	-0.36	-7.6	-0.38	167
Chloroquine	22	-6.31	-0.29	-5.47	-0.25	11
Apigenin	20	-7.32	-0.37	-7.17	-0.36	22.5
Chrysin	19	-7.31	-0.38	-7.27	-0.38	46.8
Narigenin	20	-6.88	-0.34	-6.59	-0.33	25.8
Silybin	35	-7.36	-0.21	-8	-0.23	71.1
Prothipendyl	20	-6.06	-0.30	-5.94	-0.30	135
Ribavirin	17	-4.78	-0.28	-5.44	-0.32	8.8
Mycophenolic acid	23	-5.62	-0.24	-7.21	-0.31	1.5
6-Azauridine	17	-5.11	-0.30	-4.5	-0.26	2.4
3'-NH <sub>2</sub> -3'-deoxyadenosine	19	-4.41	-0.23	-4.73	-0.25	34
JAD7	15	-6.81	-0.45	-6.67	-0.44	0.42
JAD8	15	-6.58	-0.44	-6.49	-0.43	4.2
JAD9	18	-7.15	-0.40	-7.17	-0.40	3.6
JAD16	17	-7.94	-0.47	-8.05	-0.47	40.1
JAD19	15	-6.14	-0.41	-5.89	-0.39	6.8
E225-0969	39	-8.13	-0.21	-7.38	-0.19	1.9
E528-0039	35	-7.34	-0.21	-7.01	-0.20	17.3
G118-0778	31	-8.35	-0.27	-8.57	-0.28	62.1
G544-0735	37	-8.24	-0.22	-7.56	-0.20	36.1

Tabel III. Eksperimentaalselt leitud aktiivsete CHIKV inhibiitorite molekulaarsildamise vaba energiad (kcal/mol) ja sildamise efektiivsused nsP3 valgu sidumise saitides **A** ja **B**.

Ühendi kood	Raskeid aatomeid	Sait C, $\Delta G$ , kcal/mol	(C) Sidumise efektiivsus	Sait D, $\Delta G$ , kcal/mol	(D) Sidumise efektiivsus	Sait E, $\Delta G$ , kcal/mol	(E) Sidumise efektiivsus	IC50 (EC50), $\mu M$
CND0335	24	-8.34	-0.35	-5.42	-0.23	-7.71	-0.32	3.3
CND0364	30	-9.56	-0.32	-6.63	-0.22	-9.66	-0.32	6.2
CND0366	27	-9.17	-0.34	-5.95	-0.22	-9.15	-0.34	6.2
CND0415	24	-8.53	-0.36	-6.28	-0.26	-8.22	-0.34	7.1
CND0545	29	-8.57	-0.30	-5.65	-0.19	-7.63	-0.26	5.6
CND3514	22	-8.01	-0.36	-5.34	-0.24	-7.42	-0.34	2.2
BAS 1	30	-7	-0.23	-5.27	-0.18	-7.25	-0.24	5
BAS 2	28	-8.19	-0.29	-6.03	-0.22	-8.23	-0.29	4
BAS 4	28	-7.94	-0.28	-4.91	-0.18	-7.94	-0.28	14
BAS 8	27	-7.74	-0.29	-5.3	-0.20	-7.59	-0.28	3.6
BAS 10	21	-8.72	-0.42	-5.64	-0.27	-9.23	-0.44	24
BAS 11	21	-7.85	-0.37	-5.73	-0.27	-7.99	-0.38	6.4
BAS 12	26	-9.57	-0.37	-6.6	-0.25	-9.1	-0.35	32
BAS 13	22	-8.25	-0.38	-5.92	-0.27	-7.22	-0.33	12
BAS 25	29	-7.98	-0.28	-4.66	-0.16	-7.31	-0.25	3.2
GIG 2	20	-8.28	-0.41	-5.9	-0.30	-8.02	-0.40	19
GIG 3a	20	-7.36	-0.37	-5.14	-0.26	-6.4	-0.32	225
GIG 6a	20	-7.68	-0.38	-5.56	-0.28	-7.09	-0.35	127
GIG 11a	18	-7.37	-0.41	-5.54	-0.31	-6.83	-0.38	348
GIG 11b	19	-7.1	-0.37	-5.44	-0.29	-7.25	-0.38	28
GIG 11c	18	-8.08	-0.45	-5.8	-0.32	-8.24	-0.46	32
GIG 11d	25	-9.59	-0.38	-6.9	-0.28	-8.73	-0.35	23

GIG 11e	21	-7.34	-0.35	-6.44	-0.31	-7.64	-0.36	12
GIG 11f	21	-8.21	-0.39	-6.23	-0.30	-8.31	-0.40	318
GIG 11h	19	-8.42	-0.44	-6.47	-0.34	-8.53	-0.45	131
GIG 11j	20	-7.91	-0.40	-5.99	-0.30	-8.09	-0.40	326
GIG 11k	21	-7.51	-0.36	-5.45	-0.26	-7.53	-0.36	169
GIG 11m	22	-8.08	-0.37	-5.16	-0.23	-8.29	-0.38	202
GIG 15a	24	-6.91	-0.29	-5.29	-0.22	-6.82	-0.28	68
GIG 15b	22	-7.83	-0.36	-5.81	-0.26	-8.53	-0.39	3
GIG 15c	23	-8.5	-0.37	-5.32	-0.23	-3.38	-0.15	115
GIG 15e	23	-7.81	-0.34	-5.63	-0.24	-7.17	-0.31	280
GIG 15f	26	-8.49	-0.33	-6.37	-0.25	-8.3	-0.32	204
GIG 15g	26	-8.68	-0.33	-5.94	-0.23	-8.73	-0.34	75
GIG 20	20	-7.81	-0.39	-6.35	-0.32	-7.5	-0.38	167
Chloroquine	22	-5.53	-0.25	-3.6	-0.16	-5.73	-0.26	11
Apigenin	20	-7.57	-0.38	-5.68	-0.28	-7.53	-0.38	22.5
Chrysin	19	-8.14	-0.43	-5.96	-0.31	-7.36	-0.39	46.8
Narigenin	20	-7.9	-0.40	-5.49	-0.27	-7.71	-0.39	25.8
Silybin	35	-8.91	-0.25	-4.74	-0.14	-6.6	-0.19	71.1
Prothipendyl	20	-6.12	-0.31	-4.24	-0.21	-5.91	-0.30	135
Ribavirin	17	-5.05	-0.30	-3.76	-0.22	-5.24	-0.31	8.8
Mycophenolic acid	23	-8.51	-0.37	-4.89	-0.21	-8.21	-0.36	1.5
6-Azaauridine	17	-7.36	-0.43	-3.74	-0.22	-5.59	-0.33	2.4
3'-NH <sub>2</sub> -3'-deoxyadenosine	19	-4.32	-0.23	-3.28	-0.17	-3.41	-0.18	34
JAD7	15	-7.11	-0.47	-5.2	-0.35	-7.35	-0.49	0.42
JAD8	15	-7.3	-0.49	-5.41	-0.36	-7.28	-0.49	4.2



JAD9	18	-8.09	-0.45	-5.7	-0.32	-7.82	-0.43	3.6
JAD16	17	-7.51	-0.44	-5.81	-0.34	-7.48	-0.44	40.1
JAD19	15	-6.5	-0.43	-4.87	-0.32	-6.33	-0.42	6.8
E225-0969	39	-6.96	-0.18	-5.19	-0.13	-5.99	-0.15	1.9
E528-0039	35	-6.7	-0.19	-5.12	-0.15	-6.25	-0.18	17.3
G118-0778	31	-6.4	-0.21	-5.51	-0.18	-7.6	-0.25	62.1
G544-0735	37	-8.01	-0.22	-6.79	-0.18	-7.92	-0.21	36.1

## 9. LITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputööüldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Laura Puusepp  
(sünnikuupäev: 14.10.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Esimeste Chikungunya viiruse proteaasi inhibiitorite disain ja testimine“,

mille juhendaja on Mati Karelson,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **30.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015.